

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
27. Dezember 2002 (27.12.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/103043 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷:

C12Q 1/68

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP02/06808

(22) Internationales Anmeldedatum:

19. Juni 2002 (19.06.2002)

(25) Einreichungssprache:

Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache:

Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:

101 29 410.7 19. Juni 2001 (19.06.2001) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): VERMICON AG [DE/DE]; Emmy-Noether-Strasse 2, 80992 München (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BEIMFOHR, Claudia [DE/DE]; Blutenburgstrasse 32, 80636 München (DE). SNAIDR, Jiri [DE/DE]; Ludwig-Thoma-Strasse 17, 85256 Vierkirchen (DE).

(74) Anwalt: NEUEFEIND, Regina; Maiwald Patentanwalts GmbH, Elisenhof, Elisenstrasse 3, 80335 München (DE).

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.



WO 02/103043 A2

(54) Title: METHOD FOR THE SPECIFIC FAST DETECTION OF BACTERIA WHICH IS HARMFUL TO BEER

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM SPEZIFISCHEN SCHNELLNACHWEIS BIER SCHÄDLICHER BAKTERIEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for the specific fast detection of bacteria which is harmful to beer by in situ-hybridisation. The invention also relates to oligonucleotide probes suitable for use with said method and kits enabling the inventive detection method to be carried out.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum spezifischen Schnellnachweis bierschädlicher Bakterien durch in situ-Hybridisierung, für das Verfahren geeignete Oligonukleotidsonden, sowie Kits, mit denen das Nachweisverfahren durchgeführt werden kann.

Verfahren zum spezifischen Schnellnachweis bierschädlicher Bakterien

- 5 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum spezifischen Schnellnachweis bierschädlicher Bakterien durch *in situ*-Hybridisierung, für das Verfahren geeignete Oligonukleotidsonden, sowie Kits, mit denen das Nachweisverfahren durchgeführt werden kann.
- 10 Die jährliche Bierproduktion der EU liegt bei etwa 313 Millionen Hektolitern, davon werden allein 112 Millionen Hektoliter in Deutschland hergestellt. Mit ungefähr 1270 ansässigen Brauereien und einem Jahresumsatz von etwa 18 Milliarden DM ist der Brauprozess einer der wichtigsten industriell eingesetzten biotechnologischen Prozesse in Deutschland („Daten aus der Brauwirtschaft Europa 1999“, Deutscher Brauer Bund, 2001, Bonn, <http://www.brauer-bund.de>).
- 15

Um den hohen Anforderungen an die Qualität des Produktes Bier gerecht zu werden, ist neben der Auswahl der Rohstoffe und dem Brauvorgang selbst auch die mikrobiologische Qualitätskontrolle von sehr großer Bedeutung.

- 20 Aufgrund der äußerst selektiven und teilweise bakteriziden Wirkung des Bieres ist in Brauanlagen nur ein sehr enges Spektrum von Mikroorganismen angesiedelt. Zur Persistenz im Habitat Bier müssen Mikroorganismen ein niedrigen pH-Wert, eine anaerobe Atmosphäre, Hopfenbitterstoffe, Alkohol und eine sehr geringe Nähr- und
- 25 Wuchsstoffmenge und -vielfalt tolerieren. (W. Back, Farbatlas und Handbuch der Getränkebiologie, 1994, Verlag Hans Carl, Nürnberg). Als bierschädliche Mikroorganismen sind dementsprechend überwiegend Milchsäurebakterien der Gattungen *Lactobacillus* und *Pediococcus* sowie Vertreter der Gattungen *Pectinatus* und *Megasphaera* bekannt.

- 30 Unter dem Begriff Milchsäurebakterien werden alle gram-positiven, nicht sporenbildenden, Katalase-negativen Stäbchen und Kokken zusammengefasst. Bis dato werden neun verschiedene Gattungen (*Lactobacillus*, *Lactococcus*,

Leuconostoc, Carnobacterium, Bifidobacterium, Enterococcus, Pediococcus, Weissella und Streptococcus) unter dem Begriff Milchsäurebakterien zusammengfasst. Phylogenetisch werden alle Vertreter der Milchsäurebakterien als Mitglieder der gram-positiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt der DNS

5 eingestuft. (Brock, Mikrobiologie, 2001, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg-Berlin).

Einige dieser Gattungen sind für die Lebensmittelindustrie von großer Bedeutung. So werden Vertreter der Gattungen *Lactobacillus*, *Lactococcus* und *Streptococcus* zur

10 Fermentation von Käse, Jogurt, Buttermilch, Sauerrahm, Sauerkraut, Fleisch- und Wurstprodukten und anderen Lebensmitteln eingesetzt.

Allerdings sind Milchsäurebakterien keineswegs nur im positiven Sinne relevant für die Lebensmittel- und Getränkeindustrie. Vielmehr spielen einige Vertreter

15 verschiedener Gattungen eine wichtige Rolle als Lebensmittelverderber.

So sind z. B. einige Arten der Gattungen *Lactobacillus* und *Pediococcus* für mehr als 90 % des durch mikrobielles Wachstum verursachten Bierverderbs verantwortlich.

Der durch diese Organismen verursachte Produktverderb geht mit Geschmacks- und 20 Geruchsveränderungen und in der Regel mit starker Trübung des Bieres einher.

Die Vertreter der sehr heterogenen Gattung *Lactobacillus* werden als gram-positive, nicht sporenbildende, homo- oder heterofermentative, Katalase-negative und gewöhnlich nicht bewegliche Stäbchen beschrieben. Zur Zeit sind in dieser Gattung

25 über 50 verschiedene Arten vereint, von denen nur eine sehr geringe Anzahl als bierschädlich ausgewiesen ist.

Pediokokken werden als gram-positive, nicht-sporenbildende, homofermentative, Katalase-negative und hauptsächlich in Tetraden vorkommenden Kokken

30 charakterisiert. Auch in dieser Gattung sind nur wenige Arten zum Wachstum im

- 3 -

Bier und dem daraus resultierenden Verderb des Bieres befähigt. (Brock, Mikrobiologie, 2001, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg-Berlin; Allgemeine Mikrobiologie, H. Schlegel, 1992, Georg Thieme Verlag Stuttgart).

- 5 Die folgenden Arten unter den Milchsäurebakterien sind als potentiell bierschädlich beschrieben: *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus lindneri*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pseudoplantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus fructivorans*, *Lactobacillus perolens*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus frigidus*, *Pediococcus damnosus*, *Pediococcus inopinatus* (W. Back, Farbatlas und Handbuch der Getränkebiologie, 1994, Verlag Hans Carl, Nürnberg). In der Praxis von Bedeutung sind vor allem *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus lindneri* und *Pediococcus damnosus*.
- 10
- 15 Zusätzlich zu den genannten gram-positiven Milchsäurebakterien sind auch einige gram-negative Bakterien der Gattungen *Pectinatus* und *Megasphaera* als Bierverderber bekannt. Die stäbchenförmigen Zellen der Gattung *Pectinatus* werden als strikt anaerobe, motile und leicht gekrümmte Bakterien beschrieben. Die sphaerischen oder leicht ovalen kokkoiden Zellen der Gattung *Megasphaera* zählen ebenfalls zu den strikt anaeroben Mikroorganismen. (W. Back, Farbatlas und Handbuch der Getränkebiologie, 1994, Verlag Hans Carl, Nürnberg). Während die weiter oben genannten gram-positiven Bierschädlinge als sogenannte Primärkontaminanten im Bier selbst vorkommen, treten Kontaminationen mit *Megasphaera* und *Pectinatus* zumeist erst im Abfüllbereich direkt am Abfüller auf, weswegen die
- 20
- 25 Bakterien auch als Sekundärkontaminanten bezeichnet werden.

Als bierschädliche gram-negative Bakterien wurden bislang beschrieben: *Pectinatus frisingensis*, *Pectinatus cerevisiiphilus*, *Megasphaera cerevisiae* (W. Back, Farbatlas und Handbuch der Getränkebiologie, 1994, Verlag Hans Carl, Nürnberg).

Die Heterogenität der bierschädlichen Mikroorganismen stellt höchste Anforderungen an die mikrobiologische Qualitätskontrolle in Brauereien. Hinzu kommt das im Vergleich zur Chargengröße von bis zu 1 000 Hektolitern sehr geringe Volumen (in der Regel 250 bis 500 ml) der zur Analyse verwendeten Probe (Back,

5 W. und Pöschl, P., Bypass-Membranfiltration [BM-System] – Verbesserung des Spurennachweises nach der Filtration. Brauwelt 138: 2312-2315).

Standardmäßig erfolgt der Nachweis bierschädlicher Bakterien bis heute durch Kultivierung. Hierfür stehen verschiedene Selektivmedien, wie NBB, VLB-S7S,

10 UBA und MRS, zur Verfügung. Alle eingesetzten Selektivmedien sollen das Wachstum der bierschädlichen Bakterien begünstigen, wobei gleichzeitig das Wachstum der mikrobiellen Begleitflora und/oder brauereispezifischer Hefekulturen durch Hemmstoffe inhibiert wird. Allen Kultivierungsverfahren ist gemeinsam, dass sie lediglich eine qualitative Aussage bezüglich der An- oder Abwesenheit von

15 Bierschädlingen ermöglichen. Ein quantitativer Nachweis erfolgt nicht. Die traditionellen Kultivierungsverfahren sind zudem mit bis zu zwölf Tagen Kultivierungsdauer äußerst zeitaufwendig. Dies führt zu hohen indirekten Kosten durch die notwendige Lagerung des Bieres bis zum Abschluss der Qualitätskontrolle und der Freigabe der Produktionscharge.

20 Bei jedem positiven Ergebnis der Kultivierung wäre eine nachfolgende Charakterisierung des detektierten Bierschädlings sinnvoll. Eine solche weitergehende Bestimmung erfolgt bislang deshalb nicht, weil keine anwenderfreundlichen Methoden hierfür zur Verfügung stehen. Zur genauen

25 Bestimmung des bierschädlichen Bakteriums müssten weitere physiologische Tests (wie Gram-Färbung, Zuckerverwertungsreihen) durchgeführt werden. Dies ist zum einen sehr zeitaufwendig, zum andern stellt die sachgerechte Durchführung dieser Analysen hohe Anforderungen an die Qualifikation des ausführenden Personals. Der Verzicht auf die genauere Analyse bedeutet zugleich aber den Verzicht auf die

30 Vorteile, welche in einer solchen Analyse liegen. So lässt die genaue Kenntnis des

Schädlings Rückschlüsse auf die mögliche Kontaminationsquelle zu und eröffnet so die Möglichkeit, durch effektive Bekämpfung des Bierschädlings weiteren Kontaminationen entgegen zu wirken. In diesem Zusammenhang ist es auch hilfreich zu wissen, ob immer der gleiche Bierschädling oder ob verschiedene Keime für den 5 Produktverderb verantwortlich sind.

Als logische Konsequenz aus den Schwierigkeiten, welche die traditionellen Kultivierungsverfahren beim Nachweis bierschädlicher Bakterien haben, bieten sich daher Nachweisverfahren auf Nukleinsäurebasis an.

10 Bei der PCR, der Polymerase-Kettenreaktion, wird, nach einer Voranreicherung der Untersuchungsprobe (zumeist in NBB-Medium), mit spezifischen Primern ein charakteristisches Stück des jeweiligen Bakteriengenoms amplifiziert. Findet der Primer seine Zielstelle, so kommt es zu einer millionenfachen Vermehrung eines 15 Stücks der Erbsubstanz. Bei der anschließenden Analyse, z.B. mittels eines DNA-Fragmenten auftrennenden Agarose-Gels kann eine qualitative Bewertung stattfinden. Im einfachsten Fall führt dies zu der Aussage, dass die Zielstellen für die verwendeten Primer in der untersuchten Probe vorhanden waren. Weitere Aussagen sind nicht möglich; diese Zielstellen können sowohl von einem lebenden Bakterium, 20 als auch von einem toten Bakterium oder von nackter DNA stammen. Eine Differenzierung ist hier nicht möglich. Dies erweist sich für die Untersuchung von Bierproben als äußerst problematisch. Im Bier selbst und in den unterschiedlichen auf Würzebasis bestehenden Selektivmedien ist eine hohe Anzahl toter, zur biologischen Säuerung eingesetzter Milchsäurebakterien enthalten. Da die PCR- 25 Reaktion auch bei Anwesenheit solcher toten Bakterien oder deren nackter DNA positiv ausfällt, kommt es hier fast zwangsläufig zu falsch positiven Ergebnissen. Andererseits können diverse im Bier vorhandene Stoffe eine Inhibierung des DNA amplifizierenden Enzyms, der Taq-Polymerase, herbeiführen. Dies ist eine häufige Ursache falsch negativer Ergebnisse. Eine Weiterführung der PCR-Technik stellt die 30 quantitative PCR dar, bei der versucht wird, eine Korrelation zwischen Menge an

vorhandenen Bakterien und der Menge an amplifizierter DNA herzustellen. Vorteile der PCR liegen in ihrer hohen Spezifität, leichten Anwendbarkeit und im geringen Zeitaufwand. Wesentliche Nachteile sind ihre hohe Anfälligkeit für Kontaminationen und damit falsch positive Ergebnisse sowie die bereits erwähnte fehlende

5 Möglichkeit zwischen lebenden und toten Zellen bzw. nackter DNA zu unterscheiden.

Einen einzigartigen Ansatz, die Spezifität molekularbiologischer Methoden wie der PCR zu realisieren, ohne die mit dieser Methode verbunden Nachteile in Kauf

10 nehmen zu müssen, bietet die Methode der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH; Amann, R. I., W. Ludwig und K.-H. Schleifer, 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbial. Rev. 59, S. 143-169). Hierbei können Bakterienarten, -gattungen oder -gruppen hochspezifisch identifiziert und visualisiert werden.

15

Die FISH-Technik basiert auf der Tatsache, dass es in Bakterienzellen bestimmte Moleküle gibt, die aufgrund ihrer lebenswichtigen Funktion im Laufe der Evolution nur wenig mutiert wurden: Die 16S und die 23S ribosomale Ribonukleinsäure (rRNS). Beide sind Bestandteile der Ribosomen, den Orten der Proteinbiosynthese,

20 und können aufgrund ihrer ubiquitären Verbreitung, ihrer Größe, und ihrer strukturellen und funktionellen Konstanz als spezifische Marker dienen (Woese, C. R., 1987. Bacterial evolution. Microbiol. Rev. 51, S. 221-271). Ausgehend von einer vergleichenden Sequenzanalyse können phylogenetische Beziehungen allein aufgrund dieser Daten aufgestellt werden. Dazu müssen diese Sequenzdaten in ein

25 Alignment gebracht werden. Im Alignment, welches sich auf Kenntnisse über die Sekundärstruktur und Tertiärstruktur dieser Makromoleküle stützt, werden die homologen Positionen der ribosomalen Nukleinsäuren in Einklang miteinander gebracht.

Ausgehend von diesen Daten können phylogenetische Berechnungen durchgeführt werden. Der Einsatz modernster Computertechnologie macht es möglich, auch großangelegte Berechnungen schnell und effektiv auszuführen, sowie große Datenbanken, welche die Alignment-Sequenzen der 16S-rRNA und 23S-rRNA

5 beinhalten, anzulegen. Durch den schnellen Zugriff auf dieses Datenmaterial können neu erhaltene Sequenzen in kurzer Zeit phylogenetisch analysiert werden. Diese rRNA Datenbanken können dazu verwendet werden, art- und gattungsspezifische Gensonden zu konstruieren. Hierbei werden alle verfügbaren rRNA Sequenzen miteinander verglichen und für bestimmte Sequenzstellen Sonden entworfen, die

10 spezifisch eine Bakterienart, -gattung oder -gruppe erfassen.

Bei der FISH (Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung)-Technik werden diese Gensonden, die zu einer bestimmten Region auf der ribosomalen Zielsequenz komplementär sind, in die Zelle geschleust. Die Gensonden sind i.d.R. kleine, 16-20

15 Basen lange, einzelsträngige Desoxyribonukleinsäurestücke und richten sich gegen eine Zielregion, welche typisch für eine Bakterienart oder eine Bakteriengruppe ist. Findet die fluoreszenzmarkierte Gensonde in einer Bakterienzelle ihre Zielsequenz, so bindet sie daran und die Zellen können aufgrund ihrer Fluoreszenz im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden.

20 Die FISH-Analyse wird grundsätzlich auf einem Objektträger durchgeführt, da bei der Auswertung die Bakterien durch Bestrahlung mit einem hochenergetischen Licht visualisiert, also sichtbar gemacht werden. Hierin liegt allerdings einer der Nachteile der klassischen FISH-Analyse: da auf einem Objektträger naturgemäß nur relative kleine Volumina analysiert werden können, kann die Sensitivität der Methode

25 unbefriedigend und für eine verlässliche Analyse nicht ausreichend sein. Mit der vorliegenden Erfindung werden daher die Vorteile der klassischen FISH-Analyse mit denen der Kultivierung verknüpft. Durch einen vergleichsweise kurzen Kultivierungsschritt wird sichergestellt, dass die nachzuweisenden Bakterien in

ausreichender Zahl vorliegen, bevor der Nachweis der Bakterien mittels spezifischer FISH durchgeführt wird.

Die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens zum spezifischen

- 5 Schnellnachweis bierschädlicher Bakterien umfasst somit die folgenden Schritte:
 - Kultivierung der in der untersuchten Probe enthaltenen Bakterien
 - Fixierung der in der Probe enthaltenen Bakterien
 - Inkubation der fixierten Bakterien mit Nukleinsäuresondenmolekülen, um eine Hybridisierung herbeizuführen
- 10 - Entfernen bzw. Abwaschen der nicht hybridisierten Nukleinsäuresondenmoleküle und
 - Detektieren der mit den Nukleinsäuresondenmolekülen hybridisierten Bakterien.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird unter „Kultivieren“ die Vermehrung

- 15 der in der Probe enthaltenen Bakterien in einem geeigneten Kultivierungsmedium verstanden. Die hierzu geeigneten Verfahren sind dem Fachmann wohlbekannt.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird unter „Fixieren“ der Bakterien eine Behandlung verstanden, mit der die Bakterienhülle für Nukleinsäuresonden

- 20 durchlässig gemacht wird. Zur Fixierung wird üblicherweise Ethanol verwendet. Kann die Zellwand mit diesen Maßnahmen nicht von den Nukleinsäuresonden penetriert werden, so sind dem Fachmann ausreichend weitere Maßnahmen bekannt, die zu demselben Ergebnis führen. Dazu zählen beispielsweise Methanol, Mischungen von Alkoholen, eine niederprozentige Paraformaldehydlösung oder eine
- 25 verdünnte Formaldehydlösung, enzymatische Behandlungen oder ähnliches. Es kann sich in einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ein enzymatischer Schritt zum vollständigen Aufschluss der Bakterien anschließen. Als Enzyme sind hier beispielsweise zu nennen Lysozym, Proteinase K und Mutanolysin. Dem Fachmann sind hier ausreichend geeignete Verfahren bekannt

und er wird auf einfache Weise feststellen können, welches Mittel für den Zellaufschluss je nach Bakterium besonders geeignet ist.

5 Im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden für die „Hybridisierung“ die fixierten Bakterien mit fluoreszenzmarkierten Nukleinsäuresonden inkubiert. Diese Nukleinsäuresonden, die aus einem Oligonukleotid und einem daran gebundenen Marker bestehen, können dann die Zellhülle penetrieren und sich an die der Nukleinsäuresonde entsprechenden Zielsequenz im Zellinneren binden. Die Bindung ist als Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen komplementären

10 Nukleinsäurestücken zu verstehen.

Die Nukleinsäuresonde kann dabei komplementär zu einer chromosomalen oder episomalen DNA sein, aber auch zu einer mRNA oder rRNA des nachzuweisenden Mikroorganismus. Von Vorteil ist es, eine Nukleinsäuresonde zu wählen, die zu 15 einem Bereich komplementär ist, der in einer Kopiezahl von mehr als 1 im nachzuweisenden Mikroorganismus vorliegt. Die nachzuweisende Sequenz liegt bevorzugt 500 – 100.000 mal pro Zelle vor, besonders bevorzugt 1.000 – 50.000 mal. Aus diesem Grunde wird bevorzugt die rRNA als Zielstelle verwendet, da die Ribosomen in der Zelle als Orte der Proteinbiosynthese viertausendfach in jeder 20 aktiven Zelle vorliegen.

Bei der Nukleinsäuresonde im Sinne der Erfindung kann es sich um eine DNA- oder RNA-Sonde handeln, die in der Regel zwischen 12 und 1000 Nukleotide umfassen wird, bevorzugt zwischen 12 und 500, bevorzugter zwischen 12 und 200, besonders 25 bevorzugt zwischen 17 und 50 und zwischen 15 und 40 und am meisten bevorzugt zwischen 17 und 25 Nukleotide. Die Auswahl der Nukleinsäuresonden geschieht nach den Gesichtspunkten, ob eine komplementäre Sequenz in dem nachzuweisenden Mikroorganismus vorliegt. Durch diese Auswahl einer definierten Sequenz, kann dadurch eine Bakterienart, eine Bakteriengattung oder eine ganze 30 Bakteriengruppe erfasst werden. Komplementarität sollte bei einer Sonde von 15

Nukleotiden über 100% der Sequenz gegeben sein. Bei Oligonukleotiden mit mehr als 15 Nukleotiden sind ein bis mehrere, vorzugsweise ein, zwei oder drei Fehlpaarungsstellen erlaubt.

5 Im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens haben die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle die nachstehend angegebenen Längen und Sequenzen (alle Nukleinsäuremoleküle sind in 5' → 3'-Richtung notiert).

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle sind für den Nachweis
10 bierschädlicher Milchsäurebakterien der Gattungen *Lactobacillus* und *Pediococcus*, insbesondere der Spezies *Pediococcus damnosus*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus perolens*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fructivorans*, *Lactobacillus lindneri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus brevis* sowie für den Nachweis bierschädlicher gram-negativer Bakterien der
15 Gattungen *Pectinatus* und *Megasphaera*, insbesondere der Spezies *Pectinatus frisingensis*, *Pectinatus cerevisiiphilus*, *Megasphaera cerevisiae* geeignet und werden entsprechend in dem erfindungsgemäßen Nachweisverfahren eingesetzt.

SEQ ID No. 1

20 TGG TGA TGC AAG CAC CAC

SEQ ID No. 2

ATG MTG ATG CAA GCA CCA R

25 SEQ ID NO. 3

CAT GCG GTC TCC GTG GTT

Die Sequenzen SEQ ID No. 1 bis 3 sind vor allem zum Nachweis von *Lactobacillus perolens* geeignet. SEQ ID No. 1 bis 3 stellen bevorzugte Ausführungsformen der
30 Erfindung dar.

- 11 -

SEQ ID No. 4

ACG CTG AGT GGC GCG GGT

5 SEQ ID No. 4 eignet sich vor allem zum Nachweis von *Lactobacillus buchneri*. SEQ ID No. 4 stellt eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung dar.

SEQ ID No. 5

GCG GGA CCA TCC AAA AGT G

10 SEQ ID No. 5 eignet sich vor allem zum Nachweis von *Lactobacillus plantarum*. SEQ ID No. 5 stellt eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung dar.

SEQ ID No. 6

15 GGC GGC AGG GTC CAA AAG

SEQ ID No. 6 eignet sich vor allem zum Nachweis von *Lactobacillus fructivorans*. SEQ ID No. 6 stellt eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung dar.

20 SEQ ID No. 7
CGT CAC GCC GAC AAC AGT

SEQ ID No. 7 eignet sich vor allem zum Nachweis von *Lactobacillus casei*. SEQ ID No. 7 stellt eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung dar.

25 SEQ ID No. 8
GGC GGC TAG TTC CCT AAA

SEQ ID No. 8 eignet sich vor allem zum Nachweis von *Lactobacillus coryniformis*.
30 SEQ ID No. 8 stellt eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung dar.

- 12 -

SEQ ID No. 9

ACC GTC AAC CCT TGA ACA GT

5 SEQ ID No. 10

GAC TCC CGA AGG TTA TCT

SEQ ID No. 9 und 10 stellen bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung dar.

Diese Sequenzen eignen sich besonders für den Nachweis von *Lactobacillus brevis*.

10

SEQ ID No. 11

TCG GTC AGA TCT ATC GTC

SEQ ID No. 11 eignet sich vor allem zum Nachweis von *Lactobacillus lindneri*. SEQ

15 ID No. 11 stellt eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung dar.

SEQ ID No. 12

GCT ACG TAT CAC AGC CTT

20 SEQ ID No. 12 eignet sich vor allem zum Nachweis von *Pediococcus damnosus*.

SEQ ID No. 12 stellt eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung dar.

SEQ ID No. 13

GCG GCG GAC TCC GTA AAG

25

SEQ ID No. 13 eignet sich besonders für den Nachweis von *Lactobacillus lindneri*.

SEQ ID No. 14

GCT ACC CAY GCT TTC GAG

30

- 13 -

SEQ ID No. 12 eignet sich für den Nachweis der Gattungen *Pediococcus* und *Lactobacillus*.

SEQ ID No. 15

5 CCA ATG CAC TTC TTC GGT

SEQ ID No. 15 eignet sich besonders für den Nachweis von Bakterin der Gattung *Pediococcus*, insbesondere von *P. acidilactici*, *P. pentosaceus*, *P. damnosus*, *P. parvulus*.

10

SEQ ID No. 16

GCT CGC TCC CTA AAA GGC

SEQ ID No. 16 eignet sich für den Nachweis von *L. casei*.

15

SEQ ID No. 17

ACT GCA AGC AGC TTC GGT

SEQ ID No. 17 eignet sich vor allem für den Nachweis von *L. coryniformis*.

20

SEQ ID No. 18

CGC CGC GGA TCC ATC CAA

SEQ ID NO. 18 eignet sich vor allem zum Nachweis von *L. fructivorans*.

25

SEQ ID No. 19

TGC TTT CGA GAC CTC AGC

SEQ ID No. 20

30 TTA CAA GAC CAG ACA GCC

- 14 -

SEQ ID No. 19 und 20 eignen sich für den Nachweis von *P. damnosus*.

SEQ ID No. 21

5 ACC GTC AAC CCT TGA ACA GT

SEQ ID No. 21 eignet sich für den Nachweis von *L. brevis*.

SEQ ID No. 22

10 ACG CCG CGG GAC CAT CCA

SEQ ID No. 23

AGT TCG CCA CTC ACT CAA

15 SEQ ID No. 22 und 23 eignen sich für den Nachweis von *L. plantarum*.

SEQ ID No. 24

CGC TAC CCA TGC TTT CGK G

20 SEQ ID No. 25

CCA CTA CCC ATG CTT TCG AG

SEQ ID No. 24 und 25 eignen sich für den Nachweis der Gattungen *Pediococcus* und *Lactobacillus*.

25

SEQ ID No. 26

CAA GCA CCA GCT ATC AGT

SEQ ID No. 26 eignet sich für den Nachweis von *L. lindneri*.

- 15 -

SEQ ID No. 27

ACG TCA TTC AAC GGA AGC

SEQ ID No. 27 eignet sich für den Nachweis von L. brevis.

5

SEQ ID No. 28

AGC TTC GAT GCA AGC ATC

SEQ ID No. 29

10 TACAAGACCAGACAGCCG

SEQ ID No. 30

GTTACAAGACCAGACAGC

15 SEQ ID No. 31

ACAAGACCAGACAGCCGC

SEQ ID No. 32

CGTCAGTTACAAGACCAG

20

SEQ ID No. 33

GCGTCAGTTACAAGACCA

SEQ ID No. 34

25 GAGACCTCAGCGTCAGTT

SEQ ID No. 35

AGCGTCAGTTACAAGACC

30 SEQ ID No. 36

- 16 -

CAAGACCAGACAGCCGCC

SEQ ID No. 37

ACCCATGCTTCGAGACC

5

SEQ ID No. 38

ACGTATTACCGCGGCTCG

SEQ ID No. 39

10 TAAAAAAACCGCCTGCGC

SEQ ID No. 40

ATGCTTCGAGACCTCAG

15 SEQ ID No. 41

CCATGCTTCGAGACCTC

SEQ ID No. 42

TGCTTCGAGACCTCAGC

20

SEQ ID No. 43

CATGCTTCGAGACCTCA

SEQ ID No. 44

25 CCCATGCTTCGAGACCT

SEQ ID No. 45

AGACCTCAGCGTCAGTTA

30 SEQ ID No. 46

- 17 -

CTTTCGAGACCTCAGCGT

SEQ ID No. 47

CGAGACCTCAGCGTCAGT

5

SEQ ID No. 48

GCTTTCGAGACCTCAGCG

SEQ ID No. 49

10 TCGAGACCTCAGCGTCAG

SEQ ID No. 50

TTTCGAGACCTCAGCGTC

15 SEQ ID No. 51

TTCGAGACCTCAGCGTCA

SEQ ID No. 52

TACGTATTACCGCGGCTC

20

SEQ ID No. 53

AAAAAAAACCGCCTGCGCT

SEQ ID No. 54

25 GCTTCGATGCAAGCATCT

SEQ ID No. 55

CAGCTTCGATGCAAGCAT

30 SEQ ID No. 56

- 18 -

ATCAGCTTCGATGCAAGC

SEQ ID No. 57

TCAGCTTCGATGCAAGCA

5

SEQ ID No. 58

CAGCGTCAGTTACAAGAC

SEQ ID No. 59

10 AAGACCAGACAGCCGCCT

SEQ ID No. 60

TACCCATGCTTCGAGAC

15 SEQ ID No. 61

TAGCTCCCGAAGGTTACT

SEQ ID No. 62

CGAAGGTTACTCCACCGG

20

SEQ ID No. 63

CCGAAGGTTACTCCACCG

SEQ ID No. 64

25 GCTCCCGAAGGTTACTCC

SEQ ID No. 65

CCCGAAGGTTACTCCACC

30 SEQ ID No. 66

TCCCGAAGGTTACTCCAC

SEQ ID No. 67

CTCCCGAAGGTTACTCCA

5

Die SEQ ID No. 28 bis 67 eignen sich vor allem für den Nachweis von *P. damnosus*.

SEQ ID No. 68

CCGTCAACCCTTGAACAG

10

SEQ ID No. 69

CATTCAACGGAAGCTCGT

SEQ ID No. 70

15 ACCGTCAACCCTTGAACA

SEQ ID No. 71

CTTAGCCTCACCGACTTCG

20 SEQ ID No. 72

TACCGTCAACCCTTGAAC

SEQ ID No. 73

AACGGAAGCTCGTTCGAC

25

SEQ ID No. 74

TTAGCCTCACGACTTCGC

SEQ ID No. 75

30 GCAAGCACGTATTCAAC

- 20 -

SEQ ID No. 76

TCGCCACTCGCTTCATTG

5 SEQ ID No. 77

TCAACGGAAGCTCGTCG

SEQ ID No. 78

TTCAACGGAAGCTCGTTC

10

SEQ ID No. 79

CAAGCACGTCATTCAACG

SEQ ID No. 80

15 CACGTCATTCAACGGAAG

SEQ ID No. 81

TCATTCAACGGAAGCTCG

20 SEQ ID No. 82

TGACTCCCGAAGGTTATC

SEQ ID No. 83

CGTCATTCAACGGAAGCT

25

SEQ ID No. 84

GCTTAGCCTCACGACTTC

SEQ ID No. 85

30 TTCGCCACTCGCTTCATT

SEQ ID No. 86

GTCATTCAACGGAAGCTC

5 SEQ ID No. 87

CCTGCTTCTGGGCAGATT

SEQ ID No. 88

CTGCTTCTGGGCAGATT

10

SEQ ID No. 89

GCACGTCATTCAACGGAA

SEQ ID No. 90

15 CAACGGAAGCTCGTTCGA

SEQ ID No. 91

ACGGAAGCTCGTTCGACT

20 SEQ ID No. 92

AGCACGTCATTCAACGGA

SEQ ID No. 93

TCTGGGCAGATTCCCAC

25

SEQ ID No. 94

CGGAAGCTCGTTCGACTT

SEQ ID No. 95

30 AAGCACGTCATTCAACGG

- 22 -

SEQ ID No. 96

GTTCGCCACTCGCTTCAT

5 SEQ ID No. 97

CCCTGCTTCTGGGCAGAT

SEQ ID No. 98

CTGACTCCCGAAGGTTAT

10

SEQ ID No. 99

TGCTTCTGGGCAGATTTC

SEQ ID No. 100

15 TTCTGGGCAGATTCCC

SEQ ID No. 101

ACTCCCGAAGGTTATCTC

20 SEQ ID No. 102

CTTCTGGGCAGATTCCC

SEQ ID No. 103

CTGGGCAGATTCCCACG

25

SEQ ID No. 104

ACTAATACGCCGCGGGAT

SEQ ID No. 105

30 GTGCAAGCACGTCATTCA

SEQ ID No. 106

ACGGCTGACTCCCGAAGG

5 SEQ ID No. 107

TTAGACGGCTGACTCCCG

Die Sequenzen SEQ ID No. 68 bis 107 sind für den Nachweis von *L. brevis* geeignet.

10

SEQ ID No. 108

GTCACACCGTGAGCAGTT

SEQ ID No. 109

15 CGTCACACCGTGAGCAGT

SEQ ID No. 110

CCACTCGGTAGATCTAT

20 SEQ ID No. 111

GATGCAAGCACCAGCTAT

SEQ ID No. 112

TCGGTCAGATCTATCGTC

25

SEQ ID No. 113

CGGTCAGATCTATCGTCA

SEQ ID No. 114

30 CTCGGTCAGATCTATCGT

SEQ ID No. 115

TCACACCGTGAGCAGTTG

5 SEQ ID No. 116

CCGTCACACCGTGAGCAG

SEQ ID No. 117

CTGATGCAAGCACCAGCT

10

SEQ ID No. 118

CGGCGGACTCCGTAAAGG

SEQ ID No. 119

15 GCTGATGCAAGCACCAGC

SEQ ID No. 120

ACCGTCACACCGTGAGCA

20 SEQ ID No. 121

CAGATGCAGACCAGACAG

SEQ ID No. 122

TGATGCAAGCACCAGCTA

25

SEQ ID No. 123

AGTTAGGAGACCTCGTTC

SEQ ID No. 124

30 GGCGGACTCCGTAAAGGT

- 25 -

SEQ ID No. 125

GTTAGGAGACCTCGTTCG

5 SEQ ID No. 126

AGTTGCTCTCACGGTCGT

SEQ ID No. 127

GCACCAGCTATCAGTTAG

10

SEQ ID No. 128

TACCGTCACACCGTGAGC

SEQ ID No. 129

15 AGATAACCGTCACACCGTG

SEQ ID No. 130

TAGATAACCGTCACACCGT

20 SEQ ID No. 131

TGCTCTCACGGTCGTTCT

SEQ ID No. 132

ACCATGTGGTTCTCGTTG

25

SEQ ID No. 133

ATGCAAGCACCAGCTATC

SEQ ID No. 134

30 GGCGGCGGACTCCGTAAA

SEQ ID No. 135

AGGC GGCGG ACTCCGTAA

5 SEQ ID No. 136

CACACCGTGAGCAGTTGC

SEQ ID No. 137

TTAGATACCGTCACACCG

10

SEQ ID No. 138

GAACCATGTGGTTCTCGT

SEQ ID No. 139

15 GCTCTCACGGTCGTTCTT

SEQ ID No. 140

CACCA GCTATCAGTTAGG

20 SEQ ID No. 141

GCCACTCGGT CAGATCTA

SEQ ID No. 142

GATACCGTCACACCGTGA

25

SEQ ID No. 143

TCAGATGCAGACCAGACA

SEQ ID No. 144

30 TAGGCGGCGG ACTCCGTAA

SEQ ID No. 145

CCATGTGGTCTCGTTGT

5 SEQ ID No. 146

CAAGCACCCAGCTATCAGT

SEQ ID NO. 108 bis SEQ ID No. 146 sind für den Nachweis von *L. lindneri* geeignet.

10

SEQ ID No. 147

CGCTGAGTGGCGCGGGTT

SEQ ID No. 148

15 CCGGATTCCGACGACGTT

SEQ ID No. 149

CGCCAACCTTCCCAGATT

20 SEQ ID No. 150

ACGACGTTCACGTGTGT

SEQ ID No. 151

CGACGACGTTCACGTGT

25

SEQ ID No. 152

CAAGTCCACAGTCTCGGT

SEQ ID No. 153

30 CTACCCAGCGGTGGCGGT

SEQ ID No. 154

AACCTGGCATGTTACCGT

5 SEQ ID No. 155

GCGCACAGCACCCCTTCT

SEQ ID No. 156

ACCAGTCCTAACGGTCT

10

SEQ ID No. 157

AGGTCAAGTCCACAGTCT

SEQ ID No. 158

15 TTCCCCACGTCTACCTCT

SEQ ID No. 159

TCCACTCCAACCTATCT

20 SEQ ID No. 160

GGGCTTCATTCTGGGCT

SEQ ID No. 161

GATTCTACGTCCGAGGCT

25

SEQ ID No. 162

TGCACAACTTAGCCTCCT

SEQ ID No. 163

30 CTTGCGCACAGCACCCCT

- 29 -

SEQ ID No. 164

AGTTCCCCACGTCTACCT

5 SEQ ID No. 165

GCTCCGGCTTTAAACCT

SEQ ID No. 166

AGCCTCCCCAGGAAACCT

10

SEQ ID No. 167

GTTGGTTGCTTCCCTACT

SEQ ID No. 168

15 GGCGGTGGCGCGCAACT

SEQ ID No. 169

CCCCACGTCTACCTCTAT

20 SEQ ID No. 170

CTTCCACTCCAACCTAT

SEQ ID No. 171

TCGCCAACCTTCCCAGAT

25

SEQ ID No. 172

TTGGTCCGCTCCGTACAT

SEQ ID No. 173

30 GCTGTGTCAACACCCAAT

- 30 -

SEQ ID No. 174

GCCAACCTTCCCAGATTG

5 SEQ ID No. 175

GACGACGTTCACGTGTG

SEQ ID No. 176

TACCCAGCGGTGGCGGTG

10

SEQ ID No. 177

GCACAACTTAGCCTCCTG

SEQ ID No. 178

15 GCGGTGGCGCGCAACTG

SEQ ID No. 179

ACCCAGCGGTGGCGGTGG

20 SEQ ID No. 180

CGGTGGCGCGCAACTGG

SEQ ID No. 181

TTGATTTCACCTACGGGG

25

SEQ ID No. 182

CACGCTGAGTGGCGCGGG

SEQ ID No. 183

30 AGGATCCTGAAGTGAGGG

- 31 -

SEQ ID No. 184

TCAAGTCCACAGTCTCGG

5 SEQ ID No. 185

CAGCGGTGGCGGTGGCGG

SEQ ID No. 186

CCACGCTGAGTGGCGCGG

10

SEQ ID No. 187

TCCATACGGTACCAACCGG

SEQ ID No. 147 bis 187 sind für den Nachweis von L. buchneri geeignet.

15

SEQ ID No. 188

CCGTCACGCCGACAAACAG

SEQ ID No. 189

20 ACCGTCACGCCGACAAACA

SEQ ID No. 190

ATACCGTCACGCCGACAA

25 SEQ ID No. 191

TACCGTCACGCCGACAAAC

SEQ ID No. 192

GATACCGTCACGCCGACAA

30

- 32 -

SEQ ID No. 193

GGATACCGTCACGCCGAC

SEQ ID No. 194

5 ACGCCGACAAACAGTTACT

SEQ ID No. 195

GGCTCGCTCCCTAAAAGG

10 SEQ ID No. 196

CTCTGCCGACCATTCTTC

SEQ ID No. 197

CTGCCGACCATTCTTCTC

15

SEQ ID No. 198

CGCCGACAAACAGTTACTC

SEQ ID No. 199

20 CACGCCGACAAACAGTTAC

SEQ ID No. 200

TCACGCCGACAAACAGTTA

25 SEQ ID No. 201

TCTGCCGACCATTCTTCT

SEQ ID No. 202

ACAAACAGTTACTCTGCCG

- 33 -

SEQ ID No. 203

CGGCTCGCTCCCTAAAAG

SEQ ID No. 204

5 GACAACAGTTACTCTGCC

SEQ ID No. 205

ACGGCTCGCTCCCTAAAAA

10 SEQ ID No. 206

CGACAACAGTTACTCTGC

SEQ ID No. 207

CCGACAACAGTTACTCTG

15

SEQ ID No. 208

ACTCTGCCGACCATTCTT

SEQ ID No. 209

20 CTCGCTCCCTAAAAGGGT

SEQ ID No. 210

TGCCGACCATTCTTCTCC

25 SEQ ID No. 211

GCCGACCATTCTTCTCCA

SEQ ID No. 212

CGCCATCTTCAGCCAAG

- 34 -

SEQ ID No. 213

GACGGCTCGCTCCCTAAA

SEQ ID No. 214

5 CGACCATTCTTCTCCAAC

SEQ ID No. 215

GTCACGCCGACAACAGTT

10 SEQ ID No. 216

CCTGATCTCTCAGGTGAT

SEQ ID No. 217

AACAGTTACTCTGCCGAC

15

SEQ ID No. 218

TACTCTGCCGACCATTCT

SEQ ID No. 219

20 CCGACCATTCTCTCCAA

SEQ ID No. 220

GCCGACAAACAGTTACTCT

25 SEQ ID No. 221

TTACTCTGCCGACCATT

SEQ ID No. 222

TCCCTAAAAGGGTTACGC

SEQ ID No. 223

CAACAGTTACTCTGCCGA

SEQ ID No. 224

5 AGACGGCTCGCTCCCTAA

SEQ ID No. 225

ACGCCATCTTCAGCCAA

10 SEQ ID No. 226

AACCTGATCTCTCAGGTG

SEQ ID No. 188 bis 226 sind für den Nachweis von *L. casei* geeignet.

15 SEQ ID No. 227

ACTGCAAGCAGCTTCGGT

SEQ ID No. 228

CGTCCACTGCAAGCAGCT

20

SEQ ID No. 229

GTCAATCAACGTCCACTG

SEQ ID No. 230

25 CACTGCAAGCAGCTTCGG

SEQ ID No. 231

GTCTGAATGGTTATGCGG

30 SEQ ID No. 232

TCGACGTCAGTGCCTCG

SEQ ID No. 233

CCACTGCAAGCAGCTTCG

5

SEQ ID No. 234

TGCAAGCAGCTTCGGTCG

SEQ ID No. 235

10 AAGCAGCTTCGGTCGACG

SEQ ID No. 236

AACGTCCACTGCAAGCAG

15 SEQ ID No. 237

GTCGACGTCAGTGCCTTC

SEQ ID No. 238

TCCACTGCAAGCAGCTTC

20

SEQ ID No. 239

GCAGCTTCGGTCGACGTC

SEQ ID No. 240

25 TCAATCAACGTCCACTGC

SEQ ID No. 241

ACGTCCACTGCAAGCAGC

30 SEQ ID No. 242

TCAACGTCCACTGCAAGC

SEQ ID No. 243

CAAGCAGCTTCGGTCGAC

5

SEQ ID No. 244

CGACGTCAGTGCCTCGA

SEQ ID No. 245

10 GCAAGCAGCTTCGGTCGA

SEQ ID No. 246

CAGCTTCGGTCGACGTCA

15 SEQ ID No. 247

CAATCAACGTCCACTGCA

SEQ ID No. 248

CAACGTCCACTGCAAGCA

20

SEQ ID No. 249

GACGTCAGTGCCTCGAC

SEQ ID No. 250

25 GTCCACTGCAAGCAGCTT

SEQ ID No. 251

ATCAACGTCCACTGCAAG

30 SEQ ID No. 252

CCGTCAAAGGACTAACAG

SEQ ID No. 253

GGTCTGAATGGTTATGCG

5

SEQ ID No. 254

CGTCAATCAACGTCCACT

SEQ ID No. 255

10 CAGTTACTCTAGTCCCTG

SEQ ID No. 256

AGCTTCGGTCGACGTCAG

15 SEQ ID No. 257

CTGCAAGCAGCTTCGGTC

SEQ ID No. 258

CTAGTCCCTGTTCTTCTC

20

SEQ ID No. 259

GGATACCGTCAAAGGACT

SEQ ID No. 260

25 AGCAGCTTCGGTCGACGT

SEQ ID No. 261

ACGTCAATCAACGTCCAC

30 SEQ ID No. 262

GCTTCGGTCGACGTCAGT

SEQ ID No. 263

ACGTCAGTGCCTTCGACT

5

SEQ ID No. 264

ACCATGTGGTCTGAATGG

SEQ ID No. 265

10 TCCCTAAAAGGGTTACCC

SEQ ID No. 227 bis 265 sind für den Nachweis von *L. coryniformis* geeignet.

SEQ ID No. 266

15 CTATCATTAGGCGCAGCT

SEQ ID No. 267

ACTATCATTAGGCGCAGC

20 SEQ ID No. 268

GGCGCAGCTCGTTCGACT

SEQ ID No. 269

GCAGCAGGCTCCAAAAGG

25

SEQ ID No. 270

ATTAGGCGCAGCTCGTTC

SEQ ID No. 271

30 ATCATTAGGCGCAGCTCG

SEQ ID No. 272

AGGCGCAGCTCGTTCGAC

5 SEQ ID No. 273

CGGCAGGCTCCAAAAGGT

SEQ ID No. 274

TCATTAGGCGCAGCTCGT

10

SEQ ID No. 275

GCGCAGCTCGTTCGACTT

SEQ ID No. 276

15 TTAGGCGCAGCTCGTTCG

SEQ ID No. 277

GGCAGGCTCCAAAAGGTT

20 SEQ ID No. 278

TATCATTAGGCGCAGCTC

SEQ ID No. 279

GCAGGCTCCAAAAGGTTA

25

SEQ ID No. 280

CGCAGCTCGTTCGACTTG

SEQ ID No. 281

30 CATTAGGCGCAGCTCGTT

SEQ ID No. 282
TAGGCGCAGCTCGTTCGA

5 SEQ ID No. 283
TAGATACCGTCGCGACGT

SEQ ID No. 284
TTAGATACCGTCGCGACG

10 SEQ ID No. 285
ATACCGTCGCGACGTGAG

SEQ ID No. 286
TACCGTCGCGACGTGAGC

SEQ ID No. 287
GTTAGATACCGTCGCGAC

20 SEQ ID No. 288
GATACCGTCGCGACGTGA

SEQ ID No. 289
ACCGTCGCGACGTGAGCA

25 SEQ ID No. 290
CAGGCTCCAAAAGGTTAC

SEQ ID No. 291

30 CACGCCCGTTCTTCTCTA

- 42 -

SEQ ID No. 292

GCGACGTGAGCAGTTACT

5 SEQ ID No. 293

CGCGACGTGAGCAGTTAC

SEQ ID No. 294

GCACAAAGGCCATCTTC

10

SEQ ID No. 295

AGGCAGGCAGGCTCCAAAA

SEQ ID No. 296

15 AGTTACTCTCACGCCGT

SEQ ID No. 297

GATAGCACAAAGGCCATC

20 SEQ ID No. 298

TCGCGACGTGAGCAGTTA

SEQ ID No. 299

CCACCTTAGGCAGGCAGGC

25

SEQ ID No. 300

ACCTTAGGCAGGCAGGCTC

SEQ ID No. 301

30 TAGGCAGGCAGGCTCCAAA

- 43 -

SEQ ID No. 302

GCAGTTACTCTCACGCC

5 SEQ ID No. 303

CGACGTGAGCAGTTACTC

SEQ ID No. 304

CAGTTACTCTCACGCCCG

10

Die SEQ ID No. 266 bis 304 sind für den Nachweis von *L. fructivorans* geeignet.

SEQ ID No. 305

CCATGCGGTCTCCGTGGT

15

SEQ ID No. 306

CATGCGGTCTCCGTGGTT

SEQ ID No. 307

20 TGCAGGTCTCCGTGGTTAT

SEQ ID No. 308

GACCATGCGGTCTCCGTG

25 SEQ ID No. 309

GGTGATGCAAGCACCACC

SEQ ID No. 310

CATCTTTACCCGGAGAC

30

- 44 -

SEQ ID No. 311

ATGCGGTCTCCGTGGTTA

SEQ ID No. 312

5 AGACCATGCGGTCTCCGT

SEQ ID No. 313

GTGATGCAAGCACCACCG

10 SEQ ID No. 314

ATTGGTGATGCAAGCACC

SEQ ID No. 315

TGATGCAAGCACCACCGC

15

SEQ ID No. 316

ACCATGCGGTCTCCGTGG

SEQ ID No. 317

20 TTGGTGATGCAAGCACCA

SEQ ID No. 318

CTTTACCCGGAGACCAT

25 SEQ ID No. 319

ATCTTTACCCGGAGACC

SEQ ID No. 320

TTACCCGGAGACCATGCG

- 45 -

SEQ ID No. 321

TCTTTACCCGGAGACCA

SEQ ID No. 322

5 GGTCTCCGTGGTTATACG

SEQ ID No. 323

GATGCAAGCACCACCGCA

10 SEQ ID No. 324

GAGACCATGCGGTCTCCG

SEQ ID No. 325

CGGTCTCCGTGGTTATAC

15

SEQ ID No. 326

TTTACCCGGAGACCATGC

SEQ ID No. 327

20 TGCAAGCACCACCGCAAA

SEQ ID No. 328

GGAGACCATGCGGTCTCC

25 SEQ ID No. 329

GCAAGCACCACCGCAAAC

SEQ ID No. 330

TTTTACCCGGAGACCATG

- 46 -

SEQ ID No. 331

AGCACCAACCGCAAACTGA

SEQ ID No. 332

5 AAGCACCAACCGCAAACTG

SEQ ID No. 333

CCATCTTTACCCGGAGA

10 SEQ ID No. 334

ATGCAAGCACCAACCGCAA

SEQ ID No. 335

GTCTCCGTGGTTACCGG

15

SEQ ID No. 336

GCGGTCTCCGTGGTTATA

SEQ ID No. 337

20 CAAGCACCAACCGCAAACT

SEQ ID No. 338

TCTCCGTGGTTACCGGT

25 SEQ ID No. 339

CTCCGTGGTTACCGGT

SEQ ID No. 340

GCCATCTTTACCCGGAG

- 47 -

SEQ ID No. 341

CGCCATCTTTACCCGGA

SEQ ID No. 342

5 CAGCTGATCTCTCAGCCT

SEQ ID No. 343

CGCAAACGTGACCAAACCT

10 Die SEQ ID No. 305 bis 343 eignen sich für den Nachweis von Lactobacillus perolens.

SEQ ID No. 344

AAGCTCGGACCATGCGGT

15

SEQ ID No. 345

CTTTCAAGCTCGGACCAT

SEQ ID No. 346

20 TTTCAAGCTCGGACCATG

SEQ ID No. 347

GCCATCTTCAAGCTCGG

25 SEQ ID No. 348

CAAGCTCGGACCATGCGG

SEQ ID No. 349

AGCCATCTTCAAGCTCG

- 48 -

SEQ ID No. 350

TCAAGCTCGGACCATGCG

SEQ ID No. 351

5 AGCTCGGACCATGCGGTC

SEQ ID No. 352

TTCAAGCTCGGACCATGC

10 SEQ ID No. 353

CGAAGCCATCTTCAAGC

SEQ ID No. 354

GCTCGGACCATGCGGTCC

15

SEQ ID No. 355

ATCTTCAAGCTCGGACC

SEQ ID No. 356

20 CATCTTCAAGCTCGGAC

Die SEQ ID No. 344 bis 356 eignen sich für den Nachweis von *Lactobacillus plantarum*.

25 SEQ ID No. 357

CAT GCG GCC TTT AGA TCG

SEQ ID No. 358

TCC GAC ACT CCA GTC CGG

SEQ ID No. 357 und SEQ ID No. 358 sind besonders für den Nachweis von *Megasphaera cerevisiae* geeignet. SEQ ID No. 358 stellt eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung dar.

5 SEQ ID No. 359

ATA GTG CCG TTC GTC CCC

SEQ ID No. 360

TTG CTC CGG CAC AGA AAG

10

SEQ ID No. 359 und 360 sind für den Nachweis von *Pectinatus cerevisiiphilus* besonders geeignet.

SEQ ID No. 361

15 GCC CCT TAG CCG GCT TCG GG

SEQ ID No. 362

GC GG CC CT TAG CC GG CT

20 SEQ ID No. 363

TG CG GG CC CT TAG CC GG CT

SEQ ID No. 364

CCT TGC GG CC CT TAG CCG

25

SEQ ID No. 365

CGG CC CT TAG CC GG CT TC

SEQ ID No. 366

30 TTG CG GG CC CT TAG CC GG C

- 50 -

SEQ ID No. 367

TGCGCCGTTACCGTCACC

5 SEQ ID No. 368

GGCCCTTAGCCGGCTTCG

SEQ ID No. 369

GCGCCGTTACCGTCACCA

10

SEQ ID No. 370

CGCACTTTAAGATCCGC

SEQ ID No. 371

15 GTGCGCCGTTACCGTCAC

SEQ ID No. 372

CGCCGTTACCGTCACCAA

20 SEQ ID No. 373

AGACGGTCGGTGCCTTGC

SEQ ID No. 374

GCCCTTAGCCGGCTTCGG

25

SEQ ID No. 375

GGTGCGCCGTTACCGTCA

SEQ ID No. 376

30 GACGGTCGGTGCCTTGC

- 51 -

SEQ ID No. 377

TGCCTTGC GGCCCTTAGC

5 SEQ ID No. 378

GCCTTGC GGCCCTTAGCC

SEQ ID No. 379

TGACCTGCGATTAGTAGC

10

SEQ ID No. 380

CTTGC GGCCCTTAGCCGG

SEQ ID No. 381

15 TGGTGC GCCGTTACCGTC

SEQ ID No. 382

GACCTGCGATTAGTAGCG

20 SEQ ID No. 383

CCTTAGCCGGCTTCGGGT

SEQ ID No. 384

CCGCAC TTTAAGATCCG

25

SEQ ID No. 385

CTGACCTGCGATTAGTAG

SEQ ID No. 386

30 GTGCCTTGC GGCCCTTAG

- 52 -

SEQ ID No. 387

ACGGTCGGTGCCTTGC GG

5 SEQ ID No. 388

TACTGCCATT CGTCC CCT

SEQ ID No. 389

GACCAGTTCGAATCCC AT

10

SEQ ID No. 390

CCTCAGTT CGGACCC CAT

SEQ ID No. 391

15 ACTGCCATT CGTCC C CTG

SEQ ID No. 392

TTCGGACCC CATCAC GGG

20 SEQ ID No. 393

GTT CGGACCC CATCAC GGG

SEQ ID No. 394

AGTT CGAATCCC ATCAC G

25

SEQ ID No. 395

ACCAGTT CGAATCCC ATC

SEQ ID No. 396

30 CTCAGTT CGGACCC ATC

SEQ ID No. 397

CTGCCATTCTGCCCCCTGC

5 SEQ ID No. 398

ATCCGCTTAATGTTCCGC

SEQ ID No. 399

AAGCGACAGCTAAAAGCC

10

SEQ ID No. 400

ATGACCAGTTCGAATCCC

SEQ ID No. 361 bis 400 sind für den Nachweis von Bakterien der Gattung
15 Pectinatus besonders geeignet.

SEQ ID No. 401

TCCAGGATCGGCTCCTT

20 SEQ ID No. 402

CTCCAGGATCGGCTCCTT

SEQ ID No. 403

TCAGACGCAAACCCCTCT

25

SEQ ID No. 404

GCTCCAGGATCGGCTCCT

SEQ ID No. 405

30 CTCTTCCGGCGATAGACT

SEQ ID No. 406

GCGGCCTTAGATCGTAT

5 SEQ ID No. 407

CTTCCGGCGATAGACTAT

SEQ ID No. 408

CACGGCGTATGGGTATTG

10

SEQ ID No. 409

GGTTTGCTCCAGGATCGG

SEQ ID No. 410

15 CGCAAACCCCTCTTCCGG

SEQ ID No. 411

GGGTTTGCTCCAGGATCG

20 SEQ ID No. 412

TACGGTACCGTCACGGCG

SEQ ID No. 413

ACGCAAACCCCTCTTCCG

25

SEQ ID No. 414

CGGCGATAGACTATTCA

SEQ ID No. 415

30 GACACTCCAGTCCGGCAG

- 55 -

SEQ ID No. 416

CCAGGATCGGCTCCTTC

5 SEQ ID No. 417

AGACGCAAACCCCTCTTC

SEQ ID No. 418

TCCGGCGATAGACTATT

10

SEQ ID No. 419

ATCAGACGCAAACCCCTC

SEQ ID No. 420

15 GTTGCTCCAGGATCGGC

SEQ ID No. 421

GCAAACCCCTCTTCCGGC

20 SEQ ID No. 422

CCGACACTCCAGTCCGGC

SEQ ID No. 423

CCTCTTCCGGCGATAGAC

25

SEQ ID No. 424

TCTTCCGGCGATAGACTA

SEQ ID No. 425

30 ACGGCGTATGGGTATTGA

SEQ ID No. 426

CCGGCGATAGACTATTCA

5 SEQ ID No. 427

CGACACTCCAGTCCGGCA

SEQ ID No. 428

TCCGGCAGTTCAATCCC

10

SEQ ID No. 429

TGCTCCAGGATCGGCTCC

SEQ ID No. 430

15 ATGCGGCCTTAGATCGT

SEQ ID No. 431

ATCCCTGGCACTCAATGT

20 SEQ ID No. 432

AATCAGACGCAAACCCCT

SEQ ID No. 433

CAAACCCCTTTCCGGCG

25

SEQ ID No. 434

TCATGCGGCCTTAGATC

SEQ ID No. 435

30 GACGCAAACCCCTTTCC

- 57 -

SEQ ID No. 436

TGCGGCCTTAGATCGTA

5 SEQ ID No. 437

TCTCTATCCCTGGCACTC

SEQ ID No. 438

GGCTCCTTCGCTTCCCT

10

SEQ ID No. 439

CAGGATCGGCTCCTTCG

SEQ ID No. 401 bis 439 sind für den Nachweis von *Megasphaera cerevisiae*

15 besonders geeignet.

SEQ ID No. 440

CCG CAC TTT TAA GAT CCG

20 SEQ ID No. 440 ist für den Nachweis der Gattung *Pectinatus* besonders geeignet.

SEQ ID No. 441

GAT CCG CTT AGT CAT CCG

25 SEQ ID No. 442

CTA CTG CCA TTC GTC CCC

SEQ ID No. 441 und 442 sind für den Nachweis von *Pectinatus cerevisiiphilus*
besonders geeignet.

In den Sequenzen steht K für „G+T“, M für „A+C“, R für „A+G“, W für „A+T“ und Y für „C+T“.

Gegenstand der Erfindung sind auch Abwandlungen der obigen

5 Oligonukleotidsequenzen SEQ ID No. 1 bis SEQ ID No. 442. Hierunter fallen insbesondere

a) Nukleinsäuremoleküle, die (i) mit einer der obigen Oligonukleotidsequenzen (SEQ ID No. 1 bis SEQ ID No. 442) in mindestens 80 %, 84 %, 87 % und bevorzugt in mindestens 90 %, 92 % und am meisten bevorzugt in

10 mindestens 94, 96, 98 % der Basen übereinstimmen (wobei der Sequenzbereich des Nukleinsäuremoleküls zu betrachten ist, der dem Sequenzbereich eines der oben angegebenen Oligonukleotide (SEQ ID No. 1 bis 442) entspricht, und nicht etwa die gesamte Sequenz eines u.U. im Vergleich zu den oben angegebenen Oligonukleotiden um eine bis zahlreiche

15 Basen verlängerten Oligonukleotids) oder (ii) sich von obigen Oligonukleotidsequenzen durch eine oder mehrere Deletionen und/oder Additionen unterscheiden und eine spezifische Hybridisierung mit Nukleinsäuresequenzen von bierschädlichen Milchsäurebakterien der Gattungen Lactobacillus und Pediococcus, insbesondere der Spezies

20 Pediococcus damnosus, Lactobacillus coryniformis, Lactobacillus perolens, Lactobacillus buchneri Lactobacillus plantarum, Lactobacillus fructivorans, Lactobacillus lindneri, Lactobacillus casei, Lactobacillus brevis bzw. von bierschädlichen gram-negativen Bakterien der Gattungen Pectinatus und Megasphaera, insbesondere der Spezies Pectinatus frisingensis, Pectinatus

25 cerevisiiphilus, Megasphaera cerevisiae ermöglichen. Dabei bedeutet „spezifische Hybridisierung“, daß unter den hier beschriebenen oder den dem Durchschnittsfachmann im Zusammenhang mit in situ-Hybridisierungs-techniken bekannten Hybridisierungsbedingungen nur die ribosomale RNA der Ziel-Organismen, nicht aber die rRNA von Nicht-Ziel-Organismen an das

30 Oligonukleotid bindet.

b) Nukleinsäuremoleküle, die mit einer Sequenz, die zu einem Oligonukleotid unter a) oder einer der Sonden SEQ ID No. 1 bis SEQ ID No. 442 komplementär ist, unter stringenten Bedingungen spezifisch hybridisieren,

c) Nukleinsäuremoleküle, die eine Oligonukleotidsequenz von SEQ ID No. 1 bis 442 oder die Sequenz eines Oligonukleotids nach a) oder b) umfassen und zusätzlich zu den genannten Sequenzen bzw. deren Abwandlungen nach a) oder b) mindestens ein weiteres Nukleotid aufweisen und eine spezifische Hybridisierung mit Nukleinsäuresequenzen von Zielorganismen ermöglichen.

5 10 Der Grad der Sequenzidentität eines Nukleinsäuremoleküls mit den Sonden SEQ ID No. 1 bis SEQ ID No. 442 kann mit üblichen Algorithmen bestimmt werden. Geeignet ist hier beispielsweise das Programm zur Bestimmung der Sequenzidentität, das unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> (auf diese Seite z.B. der Link „Standard nucleotide-nucleotide BLAST [blastn]“) zugänglich ist.

15 20 „Hybridisieren“ kann im Rahmen dieser Erfindung gleichbedeutend sein mit komplementär. Im Rahmen dieser Erfindung sind auch solche Oligonukleotide umfasst, die mit dem (theoretischen) Gegenstrang eines erfindungsgemäßen Oligonukleotids, einschließlich der erfindungsgemäßen Abwandlungen der SEQ ID No. 1 bis 442, hybridisieren.

25 Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresondenmoleküle können im Rahmen des erfindungsgemäßen Nachweisverfahrens mit verschiedenen Hybridisierungslösungen eingesetzt werden. Verschiedene organische Lösungsmittel können hierbei in Konzentrationen von 0 - 80 % eingesetzt werden. Durch das Einhalten von stringenten Hybridisierungsbedingungen wird gewährleistet, dass das Nukleinsäuresondenmolekül auch tatsächlich mit der Zielsequenz hybridisiert. Moderate Bedingungen im Sinne der Erfindung sind z.B. 0% Formamid in einem Hybridisierungspuffer wie er nachfolgend beschrieben ist. Stringente Bedingungen

im Sinne der Erfindung sind beispielsweise 20-80% Formamid im Hybridi-sierungspuffer.

Darüber hinaus können stringente Hybridisierungsbedingungen natürlich auch der

5 Literatur und Standardwerken entnommen werden (wie z.B. dem Manual von Sambrook et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Allgemein bedeutet "spezifisch hybridisieren", dass ein Molekül unter stringenten Bedingungen präferenziell an eine bestimmte Nukleotidsequenz bindet, wenn diese Sequenz in einem komplexen Gemisch von (z.B. Gesamt-) DNA oder

10 RNA vorliegt. Der Begriff „stringente Bedingungen“ steht für Bedingungen, unter denen eine Sonde präferenziell an ihre Zielsequenz hybridisieren wird, und zu einem deutlich geringeren Ausmaß oder überhaupt nicht an andere Sequenzen. Stringente Bedingungen sind z.T. Sequenz-abhängig und werden unter verschiedenen Umständen unterschiedlich sein. Längere Sequenzen hybridisieren spezifisch bei

15 höheren Temperaturen. Im Allgemeinen werden stringente Bedingungen so ausgewählt, dass die Temperatur etwa 5 °C unter dem thermischen Schmelzpunkt (T_m) für die spezifische Sequenz bei einer definierten Ionenstärke und einem definierten pH liegt. Die T_m ist die Temperatur (unter definierter Ionenstärke, pH und Nukleinsäurekonzentration), bei der 50% der zu der Zielsequenz komplementären

20 Sondenmoleküle zu der Zielsequenz im Gleichgewichtszustand hybridisieren. (Da die Targetsequenzen in der Regel im Überschuss vorliegen, sind im Gleichgewicht 50% der Sonden besetzt). Typischerweise sind stringente Bedingungen solche, bei denen die Salzkonzentration mindestens ungefähr 0,01 bis 1,0 M Natriumionen-Konzentration (oder ein anderes Salz) bei einem pH zwischen 7,0 und 8,3 beträgt

25 und die Temperatur mindestens ungefähr 30 °C für kurze Sonden (also z.B. 10-50 Nukleotide) beträgt. Zusätzlich können stringente Bedingungen, wie oben bereits erwähnt, durch Zugabe destabilisierender Agenzien, wie beispielsweise Formamid, erreicht werden.

Im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens enthält eine typische Hybridisierungslösung 0-80% Formamid, bevorzugt 20-60% Formamid und besonders bevorzugt 35 % Formamid und hat eine Salzkonzentration von 0,1 mol/l – 1,5 mol/l, bevorzugt 0,5 mol/l bis 1,0 mol/l, bevorzugter von 0,7 mol/l – 0,9 mol/l,

5 besonders bevorzugt von 0,9 mol/l, wobei es sich bei dem Salz vorzugsweise um Natriumchlorid handelt. Weiter umfasst die Hybridisierungslösung üblicherweise ein Detergens, wie z.B. Natriumdodecylsulfat (SDS), in einer Konzentration von 0,001 % bis 0,2 %, vorzugsweise in einer Konzentration von 0,005-0,05 %, bevorzugter 0,01-0,03 % und am meisten bevorzugt von 0,01 %. Zum Puffern der

10 Hybridisierungslösung können verschiedene Verbindungen wie Tris-HCl, Natrium-Citrat, PIPES oder HEPES verwendet werden, die üblicherweise Konzentrationen von 0,01-0,1 mol/l, bevorzugt 0,01 bis 0,08 mol/l eingesetzt werden, in einem pH-Wert-Bereich von 6,0 - 9,0, bevorzugt 7,0-8,0. Die bevorzugte erfindungsgemäße Ausführung der Hybridisierungslösung beinhaltet 0,02 mol/l Tris-HCl, pH 8,0.

15 Es versteht sich, dass der Fachmann die angegebenen Konzentrationen der Bestandteile des Hybridisierungspuffer derart auswählen kann, dass die gewünschte Stringenz der Hybridisierungsreaktion erzielt wird. Besonders bevorzugte Ausführungsformen geben stringente bis besonders stringente Hybridisierungs-

20 bedingungen wieder. Unter Einsatz dieser stringenten Bedingungen kann der Fachmann feststellen, ob ein bestimmtes Nukleinsäuremolekül einen spezifischen Nachweis von Nukleinsäuresequenzen von Ziel-Organismen ermöglicht und somit im Rahmen der Erfindung zuverlässig eingesetzt werden kann.

25 Die Konzentration der Sonde, kann je nach Markierung und Anzahl der zu erwartenden Zielstruktur stark schwanken. Um eine schnelle und effiziente Hybridisierung zu ermöglichen, sollte die Sondenmenge die Anzahl der Zielstrukturen um mehrere Größenordnungen überschreiten. Allerdings ist bei der Fluoreszenz in situ-Hybridisierung (FISH) darauf zu achten, dass eine zu hohe

30 Menge an fluoreszenzmarkierter Hybridisierungssonde zu erhöhter Hintergrund-

fluoreszenz führt. Die Menge an Sonde sollte deshalb in einem Bereich zwischen 0,5 ng/µl und 500 ng/µl, bevorzugt zwischen 1,0 ng/µl und 100 ng/µl und besonders bevorzugt bei 1,0 - 50 ng/µl liegen.

- 5 Die im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens bevorzugte Konzentration beträgt 1-10 ng jedes verwendeten Nukleinsäuremoleküls pro µl Hybridisierungslösung. Das verwendete Volumen der Hybridisierungslösung sollte zwischen 8 µl und 100 ml liegen, bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahren beträgt es 40 µl.
- 10 Die Dauer der Hybridisierung beträgt üblicherweise zwischen 10 Minuten und 12 Stunden; bevorzugt erfolgt die Hybridisierung für etwa 1,5 Stunden. Die Hybridisierungstemperatur beträgt bevorzugt zwischen 44 °C und 48 °C, besonders bevorzugt 46 °C, wobei der Parameter der Hybridisierungstemperatur, wie auch die Konzentration an Salzen und Detergenzien in der Hybridisierungslösung in Abhängigkeit von den Nukleinsäuresonden, insbesondere deren Längen und dem Grad der Komplementarität zur Zielsequenz in der nachzuweisenden Zelle optimiert werden kann. Der Fachmann ist mit hier einschlägigen Berechnungen vertraut.
- 15 Nach erfolgter Hybridisierung sollten die nicht hybridisierten und überschüssigen Nukleinsäuresondenmoleküle entfernt bzw. abgewaschen werden, was üblicherweise mittels einer herkömmlichen Waschlösung erfolgt. Diese Waschlösung kann, falls gewünscht, 0,001-0,1% eines Detergents wie SDS, wobei eine Konzentration von 0,01% bevorzugt wird, sowie Tris-HCl in einer Konzentration von 0,001-0,1 mol/l, bevorzugt 0,01-0,05 mol/l, besonders bevorzugt 0,02 mol/l, enthalten, wobei der pH-Wert von Tris-HCl im Bereich von 6,0 bis 9,0, vorzugsweise bei 7,0 bis 8,0, besonders bevorzugt bei 8,0 liegt. Ein Detergent kann enthalten sein, ist aber nicht zwingend erforderlich. Weiter enthält die Waschlösung üblicherweise NaCl, wobei die Konzentration je nach benötigter Stringenz von 0,003 mol/l bis 0,9 mol/l, bevorzugt von 0,01 mol/l bis 0,9 mol/l, beträgt. Besonders bevorzugt ist eine NaCl-
- 20
- 25
- 30

Konzentration von 0,07 mol/l. Des Weiteren kann die Waschlösung EDTA in einer Konzentration bis zu 0,01 mol/l enthalten, wobei die Konzentration vorzugsweise 0,005 mol/l beträgt. Ferner kann die Waschlösung auch dem Fachmann geläufige Konservierungsmittel in geeigneten Mengen enthalten.

5

Allgemein kommen bei dem Waschschritt Pufferlösungen zum Einsatz, die prinzipiell sehr ähnlich aussehen können, wie Hybridisierungspuffer (gepufferte Natriumchloridlösung), nur dass der Waschschritt in einem Puffer mit niedrigerer Salzkonzentration, bzw. bei höherer Temperatur durchgeführt wird.

10

Zur theoretischen Abschätzung der Hybridisierungsbedingungen kann folgende Formel verwendet werden:

$$Td = 81,5 + 16,6 \lg[\text{Na}^+] + 0,4 \times (\% \text{ GC}) - 820/n - 0,5 \times (\% \text{ FA})$$

15

Td = Dissoziationsstemperatur in °C

$[\text{Na}^+]$ = Molarität der Natriumionen

% GC = Anteil der Guanin- und Cytosinnukleotide an der Anzahl der Basen

n = Länge des Hybrids

20 % FA = Formamidgehalt

Mit Hilfe dieser Formel kann z.B. der Formamidanteil (der wegen der Toxizität des Formamids möglichst gering sein sollte) des Waschpuffers ersetzt werden durch einen entsprechend niedrigeren Natriumchloridgehalt. Allerdings ist dem Fachmann 25 aus der umfangreichen Literatur zu in situ-Hybridisierungsmethoden bekannt, dass und auf welche Weise die genannten Bestandteile variiert werden können. Bezuglich der Stringenz der Hybridisierungsbedingungen gilt das oben im Zusammenhang mit dem Hybridisierungspuffer Gesagte.

Das „Abwaschen“ der nicht gebundenen Nukleinsäuresondenmoleküle erfolgt üblicherweise bei einer Temperatur im Bereich von 44 °C bis 52 °C, bevorzugt von 44 °C bis 50 °C und besonders bevorzugt bei 46 °C für eine Dauer von 10 - 40 Minuten, vorzugsweise für 15 Minuten.

5

In einer alternativen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresondenmoleküle im sogenannten Fast-FISH-Verfahren zum spezifischen Nachweis der angegebenen Ziel-Organismen eingesetzt.

Das Fast-FISH-Verfahren ist dem Fachmann bekannt und z.B. in der deutschen

10 Patentanmeldung DE 199 36 875.9 und der internationalen Anmeldung WO 99/18234 beschrieben. Auf die in diesen Dokumenten enthaltene Offenbarung zur Durchführung der dort beschriebenen Nachweisverfahren wird hiermit ausdrücklich Bezug genommen.

15 Die spezifisch hybridisierten Nukleinsäuresondenmoleküle können anschließend in den jeweiligen Zellen detektiert werden. Voraussetzung hierfür ist, dass das Nukleinsäuresondenmolekül nachweisbar ist, z.B. dadurch dass das Nukleinsäuresondenmolekül durch kovalente Bindung mit einen Marker verknüpft ist. Als detektierbare Marker werden z.B. fluoreszierende Gruppen wie z.B. CY2

20 (erhältlich von Amersham Life Sciences, Inc., Arlington Heights, USA), CY3 (ebenfalls erhältlich von Amersham Life Sciences), CY5 (ebenfalls zu beziehen von Amersham Life Sciences), FITC (Molecular Probes Inc., Eugene, USA), FLUOS (erhältlich von Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland), TRITC (erhältlich von Molecular Probes Inc. Eugene, USA) oder FLUOS-PRIME

25 verwendet, die dem Fachmann alle wohlbekannt sind. Auch chemische Marker, radioaktive Marker oder enzymatische Marker wie Meerrettich-Peroxidase, saure Phosphatase, alkalische Phosphatase, Peroxidase, können verwendet werden. Für jedes dieser Enzyme ist eine Reihe von Chromogenen bekannt, die anstelle des natürlichen Substrates umgesetzt werden können, und entweder zu farbigen oder zu

fluoreszierenden Produkten umgesetzt werden können. Beispiele für solche Chromogene sind in der nachfolgenden Tabelle angegeben:

Tabelle

5

Enzyme	Chromogen	
1. Alkalische Phosphatase und saure Phosphatase	4-Methylumbelliferylphosphat (*), Bis(4-Methylumbelliferylphosphat), (*) 3-O-Methylfluoreszein, Flavon-3-Diphosphatriammoniumsalz (*), p-Nitrophenylphosphatdinatriumsalz	
10	Tyraminhydrochlorid (*), 3-(p-Hydroxyphenyl)-Propionsäure (*), p-Hydroxyphenethyl-alkohol(*), 2,2'-Azino-di-3-ethylbenzthiazolinsulfonsäure (ABTS), ortho-Phenylendiamindihydrochlorid, o-Dianisidin, 5-Aminosalicylsäure, p-Ucresol (*), 3,3'-dimethoxybenzidin, 3-Methyl-2-benzothiazolinhydrazon, Tetramethylbenzidin	
15	H ₂ O ₂ + Diammoniumbenzidin	
20	H ₂ O ₂ + Tetramethylbenzidin	
25	3. Meerrettichperoxidase 4. β -D-Galaktosidase 5. Glukoseoxidase	o-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid, 4-Methylumbelliferyl- β -D-galaktosid ABTS, Glukose und Thiazolylblau

*Fluoreszenz

Schließlich ist es möglich, die Nukleinsäuresondenmoleküle so zu gestalten, dass an
ihrem 5'- oder 3'-Ende eine weitere zur Hybridisierung geeignete

Nukleinsäuresequenz vorhanden ist. Diese Nukleinsäuresequenz umfasst wiederum ca. 15 bis 1.000, bevorzugt 15 – 50 Nukleotide. Dieser zweite Nukleinsäurebereich kann wiederum von einem Nukleinsäuresondenmolekül erkannt werden, welches durch eines der oben erwähnten Mittel nachweisbar ist.

5

Eine weitere Möglichkeit besteht in der Kopplung der nachweisbaren Nukleinsäuresondenmoleküle mit einem Hapten, das anschließend mit einem das Hapten erkennenden Antikörper in Kontakt gebracht werden kann. Als Beispiel für solch ein Hapten kann Digoxigenin angeführt werden. Dem Fachmann sind über die angegebenen Beispiele hinaus auch noch weitere wohlbekannt.

10

Die abschließende Auswertung ist abhängig von der Art der Markierung der verwendeten Sonde möglich mit einem Lichtmikroskop, Epifluoreszenzmikroskop, Chemoluminometer, Fluorometer u.a.

15

Ein wichtiger Vorteil des in dieser Anmeldung beschriebenen Verfahrens zum spezifischen Schnellnachweis bierschädlicher Bakterien gegenüber den weiter oben beschriebenen traditionellen Nachweismethoden ist die Schnelligkeit. Im Vergleich zu herkömmlichen Kultivierungsverfahren, die sieben bis zwölf Tage für den

20

Nachweis benötigen, liegt das Ergebnis bei Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens innerhalb von 48 Stunden vor.

Ein weiterer Vorteil liegt im gleichzeitigen Nachweis aller relevanten bierschädlichen Milchsäurebakterien sowie gleichzeitig parallel möglichen Nachweis der gram-negativen Bierschädlinge.

25

Ein weiterer Vorteil liegt in der Fähigkeit zur Unterscheidung zwischen den verschiedenen Spezies der Gattung *Lactobacillus*. Diese ist durch die Verwendung unterschiedlich markierter Nukleinsäuresondenmoleküle leicht und zuverlässig möglich.

30

Ein weiterer Vorteil liegt in der Spezifität dieses Verfahrens. Durch die verwendeten Nukleinsäuresondenmoleküle können sowohl spezifisch die Gattung *Lactobacillus* als auch hochspezifisch die Spezies *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus perolens*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus*

5 *fructivorans*, *Lactobacillus lindneri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus brevis* sowie zusätzlich die Spezies *Pediococcus damnosus* nachgewiesen und visualisiert werden. Ebenso können sowohl spezifisch die Gattung *Pectinatus* als auch hochspezifisch die Spezies *Pectinatus frisingensis* und *Pectinatus cerevisiiphilus* sowie zusätzlich die Spezies *Megasphaera cerevisiae* nachgewiesen und visualisiert werden. Durch die 10 Visualisierung der Bakterien kann eine gleichzeitige visuelle Kontrolle stattfinden. Falsch positive Ergebnisse sind somit ausgeschlossen.

Insgesamt stellt die Möglichkeit des gleichzeitigen Nachweises der genannten Keime einen wesentlichen Vorteil gegenüber dem Stand der Technik dar. Der Einsatz von

15 entsprechenden Mischungen von Sonden, insbesondere der vorangehend als bevorzugte Sonden bezeichneten Sonden, ermöglicht bspw. den gleichzeitigen Nachweis aller genannten Keime. Das ist ein immenser Vorteil, da somit alle in der Praxis relevanten bierschaedlichen Bakterien in einem Schritt erfasst werden.

20 Ein weiterer Vorteil gegenüber dem Stand der Technik ist die konkrete Zeitersparnis: die Hybridisierung dauert im Stand der Technik in der Regel 4 Stunden, beim erfindungsgemäßen Verfahren nur 1,5 Stunden.

Ein weiterer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens liegt in der leichten 25 Handhabbarkeit. So können durch das Verfahren leicht große Mengen an Proben auf das Vorhandensein der genannten Bakterien getestet werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann vielfältig angewendet werden.

Es können sowohl klare als auch hefetrübe Biere analysiert werden, außerdem z.B. Hefeproben (Reinzucht-, Ernte- oder Betriebshefen und Hefebodensätze) und Spülwässer.

5 Ein weiteres Anwendungsgebiet für das erfindungsgemäße Verfahren ist die mikrobiologische Kontrolle sämtlicher Lebensmittel, bei denen die nachgewiesenen Bakterien als Lebensmittelverderber eine Rolle spielen.

Erfindungsgemäß werden weiterhin Kits zur Durchführung des erfindungsgemäßen 10 Verfahrens zur Verfügung gestellt. Die in diesen Kits enthaltene Hybridisierungsanordnung ist z.B. in der deutschen Patentanmeldung 100 61 655.0 beschrieben. Auf die in diesem Dokument enthaltene Offenbarung bezüglich der in situ-Hybridisierungsanordnung wird hiermit ausdrücklich Bezug genommen.

15 Außer der beschriebenen Hybridisierungsanordnung (als VIT-Reactor bezeichnet) umfassen die Kits als wichtigsten Bestandteil die jeweilige Hybridisierungslösung mit den weiter oben beschriebenen für die nachzuweisenden Mikroorganismen spezifischen Nukleinsäuresondenmolekülen (als VIT-Lösung bezeichnet). Weiterhin ist jeweils enthalten der entsprechende Hybridisierungspuffer (Solution C) und ein 20 Konzentrat der entsprechenden Waschlösung (Solution D). Weiterhin sind enthalten gegebenenfalls Fixierungslösungen (Solution A und Solution B), eine zusätzliche Zellaufschlusslösung (Breaker_2) sowie gegebenenfalls eine Einbettlösung (Finisher). Finisher sind im Handel erhältlich, sie verhindern u.a. das rasche Ausbleichen fluoreszierender Sonden unter dem Fluoreszenzmikroskop.

25 Gegebenenfalls sind Lösungen zur parallelen Durchführung einer Positivkontrolle (Positive Control) sowie einer Negativkontrolle (Negative Control) enthalten.

Das folgende Beispiel soll die Erfindung erläutern, ohne sie einzuschränken:

Beispiel**Spezifischer Schnellnachweis bierschädlicher Bakterien in einer Probe**

5 Eine Probe wird in geeigneter Weise 20 – 44 h kultiviert (z.B. NBB-Medium, 48 h, 28 °C).

Ein Aliquot der Kultur wird zentrifugiert (5 min, 8 000 Upm, RT), der Überstand wird verworfen und das Sediment in einem geeigneten Volumen Fixierungslösung (10 Solution A, 50% Ethanol) resuspendiert.

Anschließend wird ein geeignetes Aliquot der fixierten Zellen (bevorzugt 40 µl) auf einen Objektträger aufgebracht und getrocknet (46 °C, 30 min oder bis vollständig trocken).

15 Anschließend werden die getrockneten Zellen vollständig dehydratisiert durch Zusatz einer weiteren Fixierungslösung (Solution B, Ethanol absolut, bevorzugt 40 µl). Der Objektträger wird erneut getrocknet (Raumtemperatur, 3 min oder bis vollständig trocken). Zum vollständigen Zellaufschluss wird ein geeignetes Volumen (20 der Zellaufschlusslösung (Breaker_2, bevorzugt 40 µl) auf den Objektträger aufgebracht und der Objektträger inkubiert (10 min, RT).

25 Die Zellaufschlusslösung wird durch Eintauchen des Objektträgers in ein mit destilliertem Wasser gefülltes Gefäß, bevorzugt den VIT-Reactor, abgewaschen und der Objektträger anschließend in seitlicher Stellung getrocknet.

Anschließend wird auf die fixierten, dehydratisierten Zellen die (30 Hybridisierungslösung (VIT-Lösung) mit den weiter oben beschriebenen für die jeweils nachzuweisenden Mikroorganismen spezifischen Nukleinsäuresondenmolekülen aufgebracht. Das bevorzugte Volumen beträgt 40 µl.

Der Objektträger wird anschließend einer mit Hybridisierungspuffer (Solution C, entspricht der Hybridisierungslösung ohne Oligonukleotide) befeuchteten Kammer, bevorzugt dem VIT-Reactor inkubiert (46 °C, 90 min).

5 Anschließend wird der Objektträger aus Kammer entnommen, die Kammer mit Waschlösung befüllt (Solution D, 1:10 verdünnt in destilliertem Wasser) und der Objektträger in dieser inkubiert (46 °C, 15 min).

Anschließend wird die Kammer mit destilliertem Wasser befüllt, der Objektträger
10 kurz eingetaucht und anschließend in seitlicher Stellung luftgetrocknet (46 °C, 30 min oder bis vollständig trocken).

Anschließend wird der Objektträger in einem geeigneten Medium (Finisher) eingebettet.

15

Abschließend wird die Probe mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops analysiert.

P A T E N T A N S P R Ü C H E

5 1. Oligonukleotid, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
Oligonukleotiden mit einer der nachfolgenden Nukleotidsequenz (jeweils in
5'->3'-Richtung)

 TGG TGA TGC AAG CAC CAC
 ATG MTG ATG CAA GCA CCA R

10 CAT GCG GTC TCC GTG GTT
 ACG CTG AGT GGC GCG GGT
 GCG GGA CCA TCC AAA AGT G
 GGC GGC AGG GTC CAA AAG
 CGT CAC GCC GAC AAC AGT

15 GGC GGC TAG TTC CCT AAA
 ACCGT CAA CCC TTG AAC AGT
 GAC TCC CGA AGG TTA TCT
 TCG GTC AGA TCT ATC GTC
 GCT ACG TAT CAC AGC CTT

20 GCG GCG GAC TCC GTA AAG
 GCT ACC CAY GCT TTC GAG
 CCA ATG CAC TTC TTC GGT
 GCT CGC TCC CTA AAA GGC
 ACT GCA AGC AGC TTC GGT

25 CGC CGC GGA TCC ATC CAA
 TGC TTT CGA GAC CTC AGC
 TTA CAA GAC CAG ACA GCC
 ACC GTC AAC CCT TGA ACA GT
 ACG CCG CGG GAC CAT CCA

30 AGT TCG CCA CTC ACT CAA

CGC TAC CCA TGC TTT CGK G
CCA CTA CCC ATG CTT TCG AG
CAA GCA CCA GCT ATC AGT
ACG TCA TTC AAC GGA AGC
5 AGC TTC GAT GCA AGC ATC
TACAAGACCAGACAGCCG
GTTACAAGACCAGACAGC
ACAAGACCAGACAGCCGC
CGTCAGTTACAAGACCAG
10 GCGTCAGTTACAAGACCA
GAGACCTCAGCGTCAGTT
AGCGTCAGTTACAAGACC
CAAGACCAGACAGCCGCC
ACCCATGCTTCGAGACC
15 ACGTATTACCGCGGCTCG
TAAAAAAAACCGCCTGCGC
ATGCTTCGAGACCTCAG
CCATGCTTCGAGACCTC
TGCTTCGAGACCTCAGC
20 CATGCTTCGAGACCTCA
CCCATGCTTCGAGACCT
AGACCTCAGCGTCAGTTA
CTTCGAGACCTCAGCGT
CGAGACCTCAGCGTCAGT
25 GCTTCGAGACCTCAGCG
TCGAGACCTCAGCGTCAG
TTTCGAGACCTCAGCGTC
TTCGAGACCTCAGCGTCA
TACGTATTACCGCGGCTC
30 AAAAAAAACCGCCTGCGCT

GCTTCGATGCAAGCATCT
CAGCTTCGATGCAAGCAT
ATCAGCTTCGATGCAAGC
TCAGCTTCGATGCAAGCA
5 CAGCGTCAGTTACAAGAC
AAGACCAGACAGCCGCCT
TACCCATGCTTCGAGAC
TAGCTCCCGAAGGTTACT
CGAAGGTTACTCCACCGG
10 CCGAAGGTTACTCCACCG
GCTCCCGAAGGTTACTCC
CCCGAAGGTTACTCCACC
TCCCGAAGGTTACTCCAC
CTCCCGAAGGTTACTCCA
15 CCGTCAACCCCTGAACAG
CATTCAACGGAAGCTCGT
ACCGTCAACCCCTGAACA
CTTAGCCTCACCGACTTCG
TACCGTCAACCCCTGAAC
20 AACGGAAGCTCGTTCGAC
TTAGCCTCACGACTTCGC
GCAAGCACGTATTCAAC
TCGCCACTCGCTTCATTG
TCAACGGAAGCTCGTTCG
25 TTCAACGGAAGCTCGTTC
CAAGCACGTATTCAACG
CACGTCAATTCAACGGAAG
TCATTCAACGGAAGCTCG
TGACTCCCGAAGGTTATC
30 CGTCATTCAACGGAAGCT

GCTTAGCCTCACGACTTC
TTCGCCACTCGCTTCATT
GTCATTCAACGGAAGCTC
CCTGCTTCTGGGCAGATT
5 CTGCTTCTGGGCAGATT
GCACGTCATTCAACGGAA
CAACGGAAGCTCGTCGA
ACCGAAGCTCGTCGACT
AGCACGTCATTCAACGGA
10 TCTGGGCAGATTCCCAC
CGGAAGCTCGTCGACTT
AAGCACGTCATTCAACGG
GTTGCCACTCGCTTCAT
CCCTGCTTCTGGGCAGAT
15 CTGACTCCCGAAGGTTAT
TGCTTCTGGGCAGATTTC
TTCTGGGCAGATTCCA
ACTCCCGAAGGTTATCTC
CTTCTGGGCAGATTCCC
20 CTGGGCAGATTCCCACG
ACTAATACGCCCGGGAT
GTGCAAGCACGTCATTCA
ACGGCTGACTCCGAAGG
TTAGACGGCTGACTCCCG
25 GTCACACCGTGAGCAGTT
CGTCACACCGTGAGCAGT
CCACTCGGTAGATCTAT
GATGCAAGCACCAGCTAT
TCGGTCAGATCTATCGTC
30 CGGTCAGATCTATCGTCA

CTCGGTCAAGATCTATCGT
TCACACCGTGAGCAGTTG
CCGTCACACCGTGAGCAG
CTGATGCAAGCACCAGCT
5 CGGCGGACTCCGTAAAGG
GCTGATGCAAGCACCAGC
ACCGTCACACCGTGAGCA
CAGATGCAGACCAGACAG
TGATGCAAGCACCAGCTA
10 AGTTAGGAGACCTCGTTC
GGCGGACTCCGTAAAGGT
GTTAGGAGACCTCGTTCG
AGTTGCTCTCACGGTCGT
GCACCAGCTATCAGTTAG
15 TACCGTCACACCGTGAGC
AGATAACCGTCACACCGTG
TAGATAACCGTCACACCGT
TGCTCTCACGGTCGTTCT
ACCATGTGGTTCTCGTTG
20 ATGCAAGCACCAGCTATC
GGCGGCGGACTCCGTAAA
AGGC GGCGGACTCCGTAA
CACACCGTGAGCAGTTGC
TTAGATAACCGTCACACCG
25 GAACCATGTGGTTCTCGT
GCTCTCACGGTCGTTCTT
CACCAAGCTATCAGTTAGG
GCCACTCGGTCAAGATCTA
GATAACCGTCACACCGTGA
30 TCAGATGCAGACCAGACA

TAGGCGGCGGACTCCGTA
CCATGTGGTTCTCGTTGT
CAAGCACCAAGCTATCAGT
CGCTGAGTGGCGCGGGTT
5 CCGGATTCCGACGACGTT
CGCCAACCTTCCCAGATT
ACGACGTTCACGTGTGT
CGACGACGTTCACGTGT
CAAGTCCACAGTCTCGGT
10 CTACCCAGCGGTGGCGGT
AACCTGGCATGTTACCGT
GCGCACAGCACCCCTCT
ACCAGTCCTAACGGTCT
AGGTCAAGTCCACAGTCT
15 TTCCCCACGTCTACCTCT
TCCACTCCAACCTATCT
GGGCTTCATTCTGGGCT
GATTCTACGTCCGAGGCT
TGCACAACTTAGCCTCCT
20 CTTGCGCACAGCACCCCT
AGTTCCCCACGTCTACCT
GCTCCGGCTTTAACCT
AGCCTCCCCAGGAAACCT
GTTGGTTGCTTCCCTACT
25 GGCGGTGGCGCGCAACT
CCCCACGTCTACCTCTAT
CTTCCACTCCAACCTAT
TCGCCAACCTTCCCAGAT
TTGGTCCGCTCCGTACAT
30 GCTGTGTCAACACCCAAT

GCCAACCTTCCCAGATTG
GACGACGTTCACGTGTG
TACCCAGCGGTGGCGGTG
GCACAACTTAGCCTCCTG
5 GCGGTGGCGCGCAACTG
ACCCAGCGGTGGCGGTGG
CGGTGGCGCGCAACTGG
TTGATTTCACCTACGGGG
CACGCTGAGTGGCGCGGG
10 AGGATCCTGAAC TGAGGG
TCAAGTCCACAGTCTCGG
CAGCGGTGGCGGTGGCGG
CCACGCTGAGTGGCGCGG
TCCATACGGTACCA CCGG
15 CCGTCACGCCGACAACAG
ACCGTCACGCCGACAACA
ATACCGTCACGCCGACAA
TACCGTCACGCCGACAAC
GATACCGTCACGCCGACA
20 GGATACCGTCACGCCGAC
ACGCCGACAACAGTTACT
GGCTCGCTCCCTAAAAGG
CTCTGCCGACCATTCTTC
CTGCCGACCATTCTTCTC
25 CGCCGACAACAGTTACTC
CACGCCGACAACAGTTAC
TCACGCCGACAACAGTTA
TCTGCCGACCATTCTTCT
ACAACAGTTACTCTGCCG
30 CGGCTCGCTCCCTAAAAG

GACAACAGTTACTCTGCC
ACGGCTCGCTCCCTAAAA
CGACAACAGTTACTCTGC
CCGACAACAGTTACTCTG
5 ACTCTGCCGACCATTCTT
CTCGCTCCCTAAAAGGGT
TGCCGACCATTCTTCTCC
GCCGACCATTCTTCTCCA
CGCCATCTTCAGCCAAG
10 GACGGCTCGCTCCCTAAA
CGACCATTCTTCTCCAAC
GTCACGCCGACAACAGTT
CCTGATCTCTCAGGTGAT
AACAGTTACTCTGCCGAC
15 TACTCTGCCGACCATTCT
CCGACCATTCTTCTCCAA
GCCGACAACAGTTACTCT
TTACTCTGCCGACCATTCT
TCCCTAAAAGGGTTACGC
20 CAACAGTTACTCTGCCGA
AGACGGCTCGCTCCCTAA
ACGCCATCTTCAGCCA
AACCTGATCTCTCAGGTG
ACTGCAAGCAGCTTCGGT
25 CGTCCACTGCAAGCAGCT
GTCAATCAACGTCCACTG
CACTGCAAGCAGCTTCGG
GTCTGAATGGTTATGCGG
TCGACGTCAGTGCAGTCG
30 CCACTGCAAGCAGCTTCG

TGCAAGCAGCTCGGTCG
AAGCAGCTCGGTCGACG
AACGTCCACTGCAAGCAG
GTCGACGTCAGTGCCTC
5 TCCACTGCAAGCAGCTC
GCAGCTCGGTCGACGTC
TCAATCAACGTCCACTGC
ACGTCCACTGCAAGCAGC
TCAACGTCCACTGCAAGC
10 CAAGCAGCTCGGTCGAC
CGACGTCAGTGCCTCGA
GCAAGCAGCTCGGTCGA
CAGCTCGGTCGACGTCA
CAATCAACGTCCACTGCA
15 CAACGTCCACTGCAAGCA
GACGTCAGTGCCTCGAC
GTCCACTGCAAGCAGCTT
ATCAACGTCCACTGCAAG
CCGTCAAAGGACTAACAG
20 GGTCTGAATGGTTATGCG
CGTCAATCAACGTCCACT
CAGTTACTCTAGTCCCTG
AGCTTCGGTCGACGTCAAG
CTGCAAGCAGCTCGGTC
25 CTAGTCCCTGTTCTTCTC
GGATACCGTCAAAGGACT
AGCAGCTCGGTCGACGTC
ACGTCAATCAACGTCCAC
GCTTCGGTCGACGTCAAGT
30 ACGTCAGTGCCTCGACT

ACCATGTGGTCTGAATGG
TCCCTAAAAGGGTTACCC
CTATCATTAGGCGCAGCT
ACTATCATTAGGCGCAGC
5 GGCAGCTCGTTCGACT
GCGGCAGGCTCCAAAAGG
ATTAGGCGCAGCTCGTTC
ATCATTAGGCGCAGCTCG
AGGCGCAGCTCGTTCGAC
10 CGGCAGGCTCCAAAAGGT
TCATTAGGCGCAGCTCGT
GCGCAGCTCGTTCGACTT
TTAGGCGCAGCTCGTTCG
GGCAGGCTCCAAAAGGTT
15 TATCATTAGGCGCAGCTC
GCAGGCTCCAAAAGGTTA
CGCAGCTCGTTCGACTTG
CATTAGGCGCAGCTCGTT
TAGGCGCAGCTCGTTCGA
20 TAGATACCGTCGCGACGT
TTAGATACCGTCGCGACG
ATACCGTCGCGACGTGAG
TACCGTCGCGACGTGAGC
GTTAGATACCGTCGCGAC
25 GATACCGTCGCGACGTGA
ACCGTCGCGACGTGAGCA
CAGGCTCCAAAAGGTTAC
CACGCCCGTTCTTCTCTA
GCGACGTGAGCAGTTACT
30 CGCGACGTGAGCAGTTAC

GCACAAAGGCCATTT
AGGCGGCAGGCTCCAAAA
AGTTACTCTCACGCCGT
GATAGCACAAAGGCCATC
5 TCGCGACGTGAGCAGTTA
CCACCTTAGGCAGGCAGGC
ACCTTAGGCAGGCAGGCTC
TAGGCAGGCAGGCTCCAAA
GCAGTTACTCTCACGCC
10 CGACGTGAGCAGTTACTC
CAGTTACTCTCACGCCCG
CCATGCGGTCTCCGTGGT
CATGCGGTCTCCGTGGTT
TGCAGGTCTCCGTGGTTAT
15 GACCATGCGGTCTCCGTG
GGTGATGCAAGCACCACC
CATTTTACCCGGAGAC
ATGCGGTCTCCGTGGTTA
AGACCATGCGGTCTCCGT
20 GTGATGCAAGCACCACCG
ATTGGTGATGCAAGCACC
TGATGCAAGCACCACCGC
ACCATGCGGTCTCCGTGG
TTGGTGATGCAAGCACCA
25 CTTTTACCCGGAGACCAT
ATCTTTACCCGGAGACC
TTACCCGGAGACCATGCG
TCTTTACCCGGAGACCA
GGTCTCCGTGGTTATACG
30 GATGCAAGCACCACCGCA

GAGACCATGCGGTCTCCG
CGGTCTCCGTGGTTATAC
TTTACCCGGAGACCATGC
TGCAAGCACCACCGCAAA
5 GGAGACCATGCGGTCTCC
GCAAGCACCACCGCAAAC
TTTTACCCGGAGACCATG
AGCACCAACCGCAAACGTGA
AAGCACCAACCGCAAACGT
10 CCATTTTACCCGGAGA
ATGCAAGCACCACCGCAA
GTCTCCGTGGTTATACGG
GCGGTCTCCGTGGTTATA
CAAGCACCAACCGCAAAC
15 TCTCCGTGGTTATACGGT
CTCCGTGGTTATACGGTA
GCCATTTTACCCGGAG
CGCCATTTTACCCGGA
CAGCTGATCTCTCAGCCT
20 CGCAAACGTACCAAAACCT
AAGCTCGGACCATGCGGT
CTTCAAGCTCGGACCAT
TTTCAAGCTCGGACCATG
GCCATTTCAAGCTCGG
25 CAAGCTCGGACCATGCGG
AGCCATTTCAAGCTCG
TCAAGCTCGGACCATGCG
AGCTCGGACCATGCGGTC
TTCAAGCTCGGACCATGC
30 CGAACCATTTCAAGC

GCTCGGACCATGCGGTCC
ATCTTTCAAGCTCGGACC
CATCTTCAAGCTCGGAC
CAT GCG GCC TTT AGA TCG
5 TCC GAC ACT CCA GTC CGG
ATA GTG CCG TTC GTC CCC
TTG CTC CGG CAC AGA AAG
GCCCC TTA GCC GGC TTC GGG
GCGGCCCTTAGCCGGCTT
10 TGCAGGCCCTTAGCCGGCT
CCTTGCAGGCCCTTAGCCG
CGGCCCTTAGCCGGCTTC
TTGCGGCCCTTAGCCGGC
TGCAGCCGTTACCGTCACC
15 GGCCCTTAGCCGGCTTCG
GCGCCGTTACCGTCACCA
CGCACTTTAACGATCCGC
GTGCGCCGTTACCGTCAC
CGCCGTTACCGTCACCAA
20 AGACGGTCGGTGCCTTGC
GCCCTTAGCCGGCTTCGG
GGTGCAGCCGTTACCGTCA
GACGGTCGGTGCCTTGC
TGCCTTGCAGGCCCTTAGC
25 GCCTTGCAGGCCCTTAGCC
TGACCTGCGATTAGTAGC
CTTGCAGGCCCTTAGCCGG
TGGTGCAGCCGTTACCGTC
GACCTGCGATTAGTAGCG
30 CCTTAGCCGGCTTCGGGT

CCGCACTTTAAGATCCG
CTGACCTGCGATTAGTAG
GTGCCTTGCGCCCTAG
ACGGTCGGTGCCTTGC
5 TACTGCCATTCGTCCCCT
GACCAGTTCGAATCCC
CCTCAGTTCGGACCCC
ACTGCCATTCGTCCC
TTCGGACCCC
10 GTTCGGACCCC
AGTTCGAATCCC
ACCAGTTCGAATCCC
CTCAGTTCGGACCCC
CTGCCATT
15 ATCCGCTTAATGTTCCGC
AAGCGACAGCTAAAAGCC
ATGACCAGTTCGAATCCC
TCCAGGATCGGCTC
CTCCAGGATCGGCTC
20 TCAGACGCAAACCC
GCTCCAGGATCGGCTC
CTCTCCGGCGATAGACT
GCGGCCTT
CTTCCGGCGATAGACT
25 CACGGCGTATGGGTATTG
GGTTTGCTCCAGGATCGG
CGCAAACCC
GGGTTTGCTCCAGGATCG
TACGGTACCGTCACGGCG
30 ACGCAAACCC
CTTCCCG

CGGCGATAGACTATTAG
GACACTCCAGTCCGGCAG
CCAGGATCGGCTCCTTC
AGACGCAAACCCCTCTTC
5 TCCGGCGATAGACTATT
ATCAGACGCAAACCCCTC
GTTTGCTCCAGGATCGGC
GCAAACCCCTCTTCCGGC
CCGACACTCCAGTCCGGC
10 CCTCTCCGGCGATAGAC
TCTTCCGGCGATAGACTA
ACGGCGTATGGGTATTGA
CCGGCGATAGACTATTCA
CGACACTCCAGTCCGGCA
15 TCCGGCAGTTCAATCCC
TGCTCCAGGATCGGCTCC
ATGCGGCCTTAGATCGT
ATCCCTGGCACTCAATGT
AATCAGACGCAAACCCCT
20 CAAACCCCTCTTCCGGCG
TCATGCGGCCTTAGATC
GACGCAAACCCCTCTTCC
TGCGGCCTTAGATCGTA
TCTCTATCCCTGGCACTC
25 GGCTCCTTCGCTTCCCT
CAGGATCGGCTCCTTCG
CCG CAC TTT TAA GAT CCG
GAT CCG CTT AGT CAT CCG
CTA CTG CCA TTC GTC CCC.

2. Verfahren zum Nachweis von bierschädlichen Bakterien in einer Probe, umfassend die Schritte

- Kultivierung der in der Probe enthaltenen Bakterien,
- 5 - Fixierung der in der Probe enthaltenen Bakterien,
- Inkubation der fixierten Bakterien mit mindestens einem Oligonukleotid nach Anspruch 1,
- um eine Hybridisierung herbeizuführen,
- Entfernen bzw. Abwaschen der nicht hybridisierten Oligonukleotide und
- 10 - Detektieren, und ggf. Quantifizieren und Visualisieren, der bierschädlichen Bakterien mit
- hybridisierten Oligonukleotiden.

3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei es sich bei den bierschädlichen Bakterien um Milchsäurebakterien der Gattungen *Lactobacillus* und *Pediococcus*, insbesondere der Spezies *Pediococcus damnosus*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus perolens*, *Lactobacillus buchneri* *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fructivorans*, *Lactobacillus lindneri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus brevis*, oder um gram-negative Bakterien der Gattungen *Pectinatus* und

15 *Megasphaera*, insbesondere der Spezies *Pectinatus frisingensis*, *Pectinatus cerevisiiphilus*, *Megasphaera cerevisiae* handelt.

4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, wobei die Probe eine Bierprobe, eine Hefeprobe oder eine Spülwasserprobe ist.

25

5. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, wobei die Probe eine Lebensmittelprobe ist.

6. Verwendung eines Oligonukleotids nach Anspruch 1 zum Nachweis von bierschädlichen Bakterien in einer Probe.

7. Verwendung eines Oligonukleotids nach Anspruch 6, wobei es sich bei den bierschädlichen Bakterien um Milchsäurebakterien der Gattungen *Lactobacillus* und *Pediococcus*, insbesondere der Spezies *Pediococcus damnosus*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus perolens*, *Lactobacillus buchneri* *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fructivorans*, *Lactobacillus lindneri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus brevis*, oder um gram-negative Bakterien der Gattungen *Pectinatus* und *Megasphaera*, insbesondere der Spezies *Pectinatus frisingensis*, *Pectinatus cerevisiiphilus*, *Megasphaera cerevisiae* handelt.
8. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 2 bis 5, enthaltend mindestens ein Oligonukleotid nach Anspruch 1.
9. Kit nach Anspruch 8, in dem das mindestens eine Oligonukleotid in einer Hybridisierungslösung enthalten ist.
10. Kit nach Anspruch 8 oder 9, weiter enthaltend eine Waschlösung und ggf. eine oder mehrere Fixierungslösungen sowie ggf. eine Zellaufschluss- bzw. Enzymlösung.

**(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG**

**(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro**



**(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
27. Dezember 2002 (27.12.2002)**

PCT

**(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/103043 A3**

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/06808

(22) Internationales Anmeldedatum:
19. Juni 2002 (19.06.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 29 410.7 19. Juni 2001 (19.06.2001) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): VERMICON AG [DE/DE]; Emmy-Noether-Strasse 2, 80992 München (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BEIMFOHR, Claudia [DE/DE]; Blutenburgstrasse 32, 80636 München (DE). SNAIDR, Jiri [DE/DE]; Ludwig-Thoma-Strasse 17, 85256 Vierkirchen (DE).

(74) Anwalt: NEUEFEIND, Regina; Maiwald Patentanwalts GmbH, Elisenhof, Elisenstrasse 3, 80335 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, ÖM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

**(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts:** 25. September 2003

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

WO 02/103043 A3

(54) Title: METHOD FOR THE SPECIFIC FAST DETECTION OF BACTERIA WHICH IS HARMFUL TO BEER

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM SPEZIFISCHEN SCHNELLNACHWEIS BIER SCHÄDLICHER BAKTERIEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for the specific fast detection of bacteria which is harmful to beer by in situ-hybridisation. The invention also relates to oligonucleotide probes suitable for use with said method and kits enabling the inventive detection method to be carried out.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum spezifischen Schnellnachweis bierschädlicher Bakterien durch in situ-Hybridisierung, für das Verfahren geeignete Oligonukleotidsonden, sowie Kits, mit denen das Nachweisverfahren durchgeführt werden kann.

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, SEQUENCE SEARCH, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category [*]	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95 07289 A (AMOCO CORP) 16 March 1995 (1995-03-16) claims 1,7,8,10-12; example 4 ---	1-10
X	WO 01 23605 A (BIOTECON DIAGNOSTICS GMBH ;FANDKE MARKUS (DE); GASCH ALEXANDER (DE) 5 April 2001 (2001-04-05) claim 9 ---	1-10
X	WO 00 65093 A (SCIENCE & TECHNOLOGY CORP ;THOMPSON CURTIS T (US); SPIDLE JOSEPH A) 2 November 2000 (2000-11-02) claim 1 ---	1-10
X	EP 0 497 464 A (AMOCO CORP) 5 August 1992 (1992-08-05) claim 1 -----	1-10

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

^{*} Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 March 2003

Date of mailing of the international search report

24 06 2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gabriels, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. _____

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see supplemental sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
claim 1-10 (partially)

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

EP02/06808

EP02/06808

The International Searching Authority has determined that this international application contains more than one invention or group of inventions, namely:

1. Claims 1-10 (all in part)

Invention 1:

An oligonucleotide according to SEQ. ID. No. 1 for determining beer spoilage bacteria; applications, methods and kits using or containing this oligonucleotide.

2. Claims 1-10 (all in part)

Invention 2:

An oligonucleotide according to SEQ. ID. No. 2 for determining beer spoilage bacteria; applications, methods and kits using or containing this oligonucleotide.

Inventions 3 to 442:

As invention 2, but restricted to SEQ. ID. Nos 3 to 442 (invention 3 being SEQ. ID. No. 3, ..., invention 442 being SEQ. ID. No. 442).

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 9507289	A	16-03-1995	US	5484909 A		16-01-1996
			EP	0674650 A1		04-10-1995
			JP	8503620 T		23-04-1996
			WO	9507289 A1		16-03-1995
			US	5705339 A		06-01-1998
WO 0123605	A	05-04-2001	DE	19945964 A1		05-04-2001
			AU	7285900 A		30-04-2001
			BR	0014518 A		11-06-2002
			CA	2385652 A1		05-04-2001
			CN	1376206 T		23-10-2002
			WO	0123605 A2		05-04-2001
			EP	1214450 A2		19-06-2002
			JP	2003510091 T		18-03-2003
WO 0065093	A	02-11-2000	AU	4656200 A		10-11-2000
			AU	4656300 A		10-11-2000
			WO	0065092 A2		02-11-2000
			WO	0065093 A2		02-11-2000
EP 0497464	A	05-08-1992	EP	0497464 A1		05-08-1992
			JP	7177900 A		18-07-1995

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/06808

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, SEQUENCE SEARCH, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^a	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 95 07289 A (AMOCO CORP) 16. März 1995 (1995-03-16) Ansprüche 1,7,8,10-12; Beispiel 4 ----	1-10
X	WO 01 23605 A (BIOTECON DIAGNOSTICS GMBH ;FANDKE MARKUS (DE); GASCH ALEXANDER (DE) 5. April 2001 (2001-04-05) Anspruch 9 ----	1-10
X	WO 00 65093 A (SCIENCE & TECHNOLOGY CORP ;THOMPSON CURTIS T (US); SPIDLE JOSEPH A) 2. November 2000 (2000-11-02) Anspruch 1 ----	1-10
X	EP 0 497 464 A (AMOCO CORP) 5. August 1992 (1992-08-05) Anspruch 1 -----	1-10

 Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

5. März 2003

24.06.2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Gabriels, J

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 02/06808

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

2. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich

3. Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.

2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.

3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.

4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:
Ansprüche 1-10 (alle teilweise)

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
 Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: Ansprüche 1-10 (alle teilweise)

Erfindung 1:

Ein Oligonukleotid nach SEQ ID NO:1 für die Bestimmung von bierschädlicher Bakterien. Anwendungen, Verfahren und Kits die dieses Oligonukleotid benutzen oder enthalten.

2. Ansprüche: Ansprüche 1-10 (alle teilweise)

Erfindung 2:

Ein Oligonukleotid nach SEQ ID NO:2 für die Bestimmung von bierschädlicher Bakterien. Anwendungen, Verfahren und Kits die dieses Oligonukleotid benutzen oder enthalten.

Erfindung 3 bis 442:

Wie Erfindung 2 aber beschränkt auf die SEQ ID No: 3 bis 442 (wo Erfindung 3 = SEQ ID No:3, ..., Erfindung 442 = SEQ ID No:442).

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9507289	A	16-03-1995	US	5484909 A		16-01-1996
			EP	0674650 A1		04-10-1995
			JP	8503620 T		23-04-1996
			WO	9507289 A1		16-03-1995
			US	5705339 A		06-01-1998
WO 0123605	A	05-04-2001	DE	19945964 A1		05-04-2001
			AU	7285900 A		30-04-2001
			BR	0014518 A		11-06-2002
			CA	2385652 A1		05-04-2001
			CN	1376206 T		23-10-2002
			WO	0123605 A2		05-04-2001
			EP	1214450 A2		19-06-2002
			JP	2003510091 T		18-03-2003
WO 0065093	A	02-11-2000	AU	4656200 A		10-11-2000
			AU	4656300 A		10-11-2000
			WO	0065092 A2		02-11-2000
			WO	0065093 A2		02-11-2000
EP 0497464	A	05-08-1992	EP	0497464 A1		05-08-1992
			JP	7177900 A		18-07-1995